



**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**ACCIONES OSTEOGÉNICAS DE LA  
PROTEÍNA RELACIONADA CON LA  
PARATHORMONA (PTHRP) SOBRE LA  
REGENERACIÓN ÓSEA  
COMPROMETIDA POR  
GLUCOCORTICOIDES Y EN LA  
OSTEOPOROSIS EXPERIMENTAL POR  
DEPLECIÓN ESTROGÉNICA EN RATÓN**

**TESIS DOCTORAL**

**LUIS ALFONSO FERNÁNDEZ DE CASTRO DÍAZ**

**Madrid, 2009**



**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**ACCIONES OSTEOGÉNICAS DE LA  
PROTEÍNA RELACIONADA CON LA  
PARATHORMONA (PTHRP) SOBRE LA  
REGENERACIÓN ÓSEA  
COMPROMETIDA POR  
GLUCOCORTICOIDES Y EN LA  
OSTEOPOROSIS EXPERIMENTAL POR  
DEPLECIÓN ESTROGÉNICA EN RATÓN**

**TESIS DOCTORAL**

**LUIS ALFONSO FERNÁNDEZ DE CASTRO DÍAZ**  
**Licenciado en Biología**

**Directores: Pedro Esbrit Argüelles,  
Enrique Gomez Barrena**

**LABORATORIO DE METABOLISMO MINERAL Y ÓSEO  
FUNDACIÓN JIMENEZ DÍAZ (Grupo Capiro)**

El **Dr. Pedro Esbrit Argüelles**, Jefe Asociado del Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid y el **Dr. Enrique Gomez Barrena**, Prof. Titular de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Dpto. de Cirugía de la Facultad de Medicina U.A.M.

INFORMAN:

Que **D. Luis Fernández de Castro Díaz**, Licenciado en Biología por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a la tesis doctoral: **“Acciones osteogénicas de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) sobre la regeneración ósea comprometida por glucocorticoides y en la osteoporosis experimental por depleción estrogénica en ratón”**

Revisado el presente trabajo, estiman que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedan conformes con su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente en Madrid, a once de noviembre de dos mil nueve.

Dr. Pedro Esbrit Argüelles

Dr. Enrique Gomez Barrena

***A Pía***

***A mis padres***



## Abreviaturas

3-Mpred	3-metilprednisolona
ADN	Acido desoxiribonucleico
ALP	Fosfatasa alcalina
Ap2	Proteína de unión de ácidos grasos 2
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
BMU	Unidad básica multicelular
BV	Hueso trabecular total
Cat K	Catepsina K
CTR	Receptor de calcitonina
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DE	Desviación estandar
DEXA	Densitometría por absorciometría de rayos X de energía dual
DEXA	Absorciometría de rayos X de energía dual
Dkk1	Proteína Dickkopf 1
DMO	Densidad mineral ósea
EEM	Error estandar de la media
Eph	Receptor de efrina
ER	Receptor de estrógenos
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
FGFs	Factores de crecimiento de los fibroblastos
GCs	Glucocorticoides
GH	Hormona de crecimiento
GIO	Osteoporosis inducida por exceso de glucocorticoides
Gla	$\gamma$ -glutamil di-carboxílico
IGF	Factor de crecimiento relacionado con la insulina
IGFBPs	Proteinas de unión de factores de crecimiento relacionados con la insulina
IL-1	Interleucina 1
IRS	Substrato de receptor de insulina
JNK	quinasa de Jun N-terminal
MC-SF	Factor estimulador de colonias de macrófagos

NLS	Secuencias de localización nuclear
NF-κB	Factor nuclear κB
NO	Óxido nítrico
OC	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OSX	Factor de transcripción osterix
OV	Volumen ocupado por osteoide
OVX	Ovariectomía/Ovareiectomizados
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PGs	Prostaglandinas
PKC	Proteína quinasa C
PPARγ	Receptor activado de proliferación de peroxisomas
pqCT	Tomografía computerizada cuantitativa periférica
PTH	Parathormona
PTHrP	Proteína relacionada con la Parathormona
PYD	Piridolina
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear κB
Runx2	Factor de transcripción 2 relacionado con RUNT
SAM/P6	Senescence accelerated Mouse P6
SERMs	Moduladores selectivos de receptores de estrógenos
Sham	Operación simulada
SOST	Gen de la esclerostina
T/A	Temperatura ambiental
T <sub>3</sub>	Triyodotironina
TFS	Tampón Fosfato Salino
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato-resistente
TSF	Tampón salino fosfato
VDR	Receptor de vitamina D
Vit D	Vitamina D
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor de factor de crecimiento del endotelio vascular

Wnt	Proteínas wingless-type
μ-CT	Microtomografía computarizada

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1 El metabolismo óseo	1
1.1 El hueso	1
1.2 Formación del hueso	4
1.3 Remodelado óseo	4
1.3.1 Regulación del remodelado óseo	7
1.3.1.1 Regulación endocrina del metabolismo óseo	7
1.3.1.2 Regulación mecánica del metabolismo óseo	9
1.3.1.3 Factores locales de regulación del remodelado óseo	10
1.4 Papel de la Proteína relacionada con la PTH (PTHrP) en el hueso	14
2 Osteoporosis	18
2.1 Osteoporosis postmenopáusica	20
2.2 Osteoporosis inducida por glucocorticoides (GIO)	21
2.3 Modelos <i>in vivo</i> de pérdida de masa ósea	22
2.4 Tratamientos para combatir la osteoporosis	24
2.4.1 Tratamientos no farmacológicos	24
2.4.2 Estrógenos y Moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERMs)	24
2.4.3 Bifosfonatos	25
2.4.4 PTH	26
2.4.5 Calcitonina	27
2.5 La PTHrP como posible agente osteogénico en la osteoporosis	28
2.6 La regeneración ósea en condiciones de osteopenia	29
2.6.1 El modelo de regeneración ósea por abación de médula	30
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
○ Modelo de regeneración ósea en ratones tratados con GCs	34
○ Modelo de osteoporosis en ratones ovariectomizados (OVX)	35
○ Densitometría por absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA)	36
○ Histología e inmunohistoquímica	36
▪ Histología: Tricrómico de Masson	37
▪ Histoquímica: Tinción vascular con lectina	37
▪ Inmunohistoquímica	38

○	Histomorfometría	40
▪	Análisis de los frentes de mineralización	40
▪	Tinción de Von Kossa	41
▪	Tricrómico de Goldner	41
▪	Determinación de los parámetros histomorfométricos	41
○	PCR cuantitativa a tiempo real	42
○	Cultivo primario de osteoprogenitores	43
▪	Determinación de las colonias ALP+ y colonias totales	44
▪	Determinación de las colonias mineralizadas	44
○	Microtomografía computerizada	45
○	Análisis de bioquímicos en plasma	48
▪	Marcadores de remodelado óseo	48
▪	Niveles iónicos	48
○	Análisis estadístico	49
<b>RESULTADOS</b>		<b>50</b>
•	Modelo de regeneración ósea en ratones tratados con GCs	50
•	Modelo de osteoporosis en ratones OVX	61
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>73</b>
<b>CONCLUSIONES</b>		<b>81</b>
<b>BIBLIOGRFÍA</b>		<b>82</b>

# INTRODUCCIÓN

# INTRODUCCIÓN

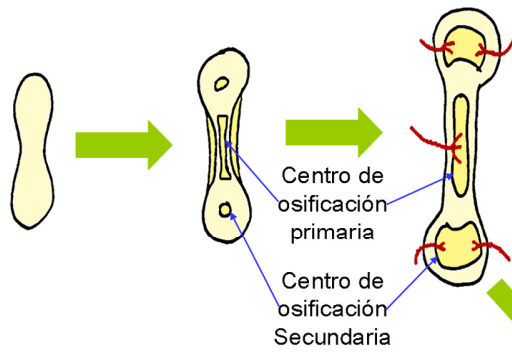
## 3 El metabolismo óseo

### 3.1 El hueso

El hueso es el órgano principal del sistema esquelético. Está formado por tejido conjuntivo calcificado y sus principales funciones son las de dar soporte, protección y movilidad al resto de los tejidos y órganos del cuerpo, además de actuar como reservorio de calcio y fósforo. Los huesos albergan a la médula ósea, responsable de la formación de la mayoría de las células óseas y sanguíneas y poseedora de una importante reserva de grasa. Existen dos tipos principales de hueso: los huesos largos (como el fémur y la tibia) y los huesos planos (como el cráneo). Existen también huesos irregulares, generalmente pequeños, que no pertenecen a las anteriores categorías (huesos de las articulaciones). Los huesos largos están formados por una diáfisis, que alberga en su interior a la médula ósea, y dos epífisis, separadas de ésta por la metáfisis, donde se localiza la placa de crecimiento. La superficie ósea externa de la diáfisis se denomina *periósteo* y la interna *endósteo* (ver Fig. 1).

Macroscópicamente, el hueso está organizado formando dos estructuras diferentes: El tejido cortical y el trabecular. El tejido óseo cortical o compacto es más denso y forma la capa exterior de los huesos. En humanos, está mayormente formado por unas estructuras llamadas osteonas o sistema haversiano, menos frecuente en roedores, especialmente en ratones [1]. Las osteonas son estructuras cilíndricas de unos 200  $\mu\text{m}$  de diámetro y varios mm de longitud en humanos con un canal vascularizado central, el canal haversiano. Este canal está rodeado por múltiples capas de hueso, entre las cuales quedan embebidos los osteocitos (ver más adelante) (Fig. 1). El tejido trabecular o esponjoso ocupa al menos una parte del interior de los huesos, formando una malla de estructuras cilíndricas o planas interconectadas llamadas trabéculas. Entre las trabéculas se encuentra la médula ósea, altamente vascularizada. Este tipo de hueso es metabólicamente más activo

## Osificación endocondral:



## Morfología del hueso largo:

### Unidad multicelular de remodelado (BMU):

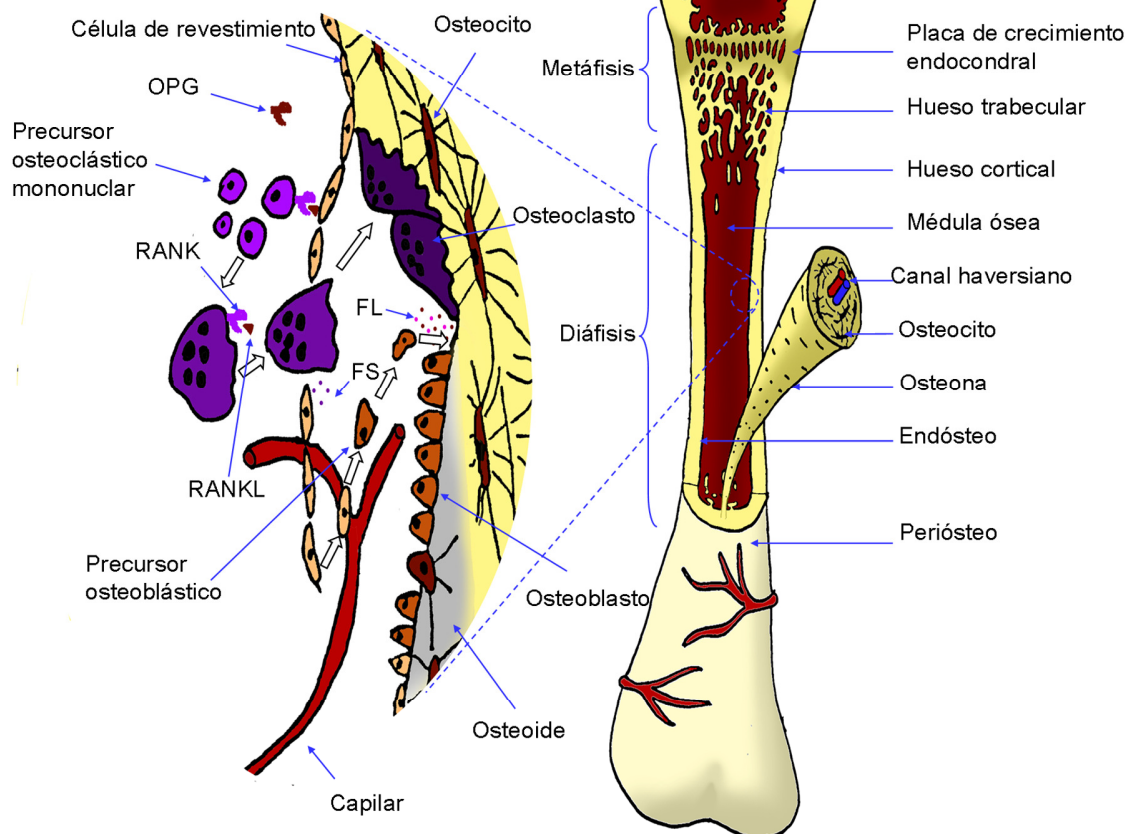


Figura 1. Formación ósea endocondral durante el desarrollo. Esquema morfológico de un hueso largo. Unidad multicelular de remodelado (BMU): tipos celulares y sus estadios de diferenciación. FS: factores secretados y FL: factores liberados de regulación del remodelado.



que el cortical y aunque sólo constituye un 20% de la masa ósea total, es responsable del 60% del remodelado óseo [2]. El contenido en hueso trabecular y cortical es variable entre los distintos huesos que constituyen el esqueleto; en tibia o fémur, el contenido de hueso cortical es mayor, mientras que en las vértebras predomina el hueso trabecular.

El tejido óseo está formado casi a partes iguales por una matriz proteica, cuyo componente principal es el colágeno tipo I, e intrínsecamente ligado a ésta, por un componente mineral de cristales de hidroxapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ . Por la disposición espacial de los cristales y fibras de colágeno distinguimos dos tipos de hueso: lamelar y no lamelar (woven bone, en inglés). El hueso lamelar [3] está constituido por unidades de seis fibras antiparalelas de colágeno mineralizado y presenta gran resistencia mecánica, mientras que en el hueso no lamelar las fibras de colágeno están menos organizadas. Cuando existe un daño en el tejido óseo, primero es reparado con tejido no lamelar que posteriormente será sustituido por tejido lamelar.

Las principales células implicadas en el metabolismo óseo son (Fig. 1):

**Osteoblastos:** Células procedentes de la línea mesenquimal, son las responsables de la formación ósea, generando nueva matriz proteica y mineralizándola posteriormente. Cuando no son metabólicamente activos permanecen asociados a la superficie ósea en forma de células de revestimiento (*lining cells*).

**Osteoclastos:** Células multinucleadas procedentes de la línea hematopoyética como producto de la diferenciación y fusión de varios precursores de la línea monocitaria. Son los responsables de la resorción ósea, proceso de degradación del componente mineral y proteico del tejido óseo.

**Osteocitos:** Células de la línea osteoblástica que quedan embebidas en el hueso mineralizado en la etapa de formación, dentro de una laguna osteocitaria. Generan una red de prolongaciones citoplasmáticas en forma de canalículos interconectados a través de uniones intercelulares *gap* o de hendidura. Son sensibles a estímulos mecánicos y están implicados en la detección de microfracturas óseas, activando el proceso de remodelado.

### **3.2 Formación ósea**

Durante el desarrollo embriogénico y el crecimiento, el hueso se genera mediante dos procedimientos distintos: La osificación intramembranosa y la osificación endocondral. La osificación intramembranosa es típica de los huesos planos, como las calotas del cráneo. El hueso se forma a partir de un tejido mesenquimal que se calcifica formando dos capas de hueso cortical y una capa de hueso trabecular entre ellas. La osificación endocondral es más compleja, al permitir el crecimiento longitudinal, y la observamos en los huesos largos. A partir de un molde cartilaginoso preexistente, a las 12 semanas de desarrollo fetal (en humanos) se desarrolla un centro de osificación primaria, seguido de dos centros de osificación secundaria, que darán lugar respectivamente a la diáfisis y las epífisis (Fig. 1). Así, el tejido cartilaginoso va retirándose, siendo calcificado y reemplazado por tejido óseo vascularizado, y queda recluido a las placas de crecimiento, que están localizadas en las metáfisis (entre la diáfisis y las epífisis). Los condrocitos entonces se organizan en columnas, que permitirán la elongación de los huesos durante el crecimiento. Esta zona está formada por cartílago hasta que se alcanza la edad adulta (entre los 18 y los 25 años en el hombre), siendo entonces calcificada y fusionada. Es en esta etapa cuando el esqueleto alcanza el pico de masa ósea, que comenzará a descender paulatinamente tanto en varones como en mujeres, aunque en éstas este descenso se acentúa considerablemente en la etapa postmenopáusica.

### **3.3 Remodelado óseo**

El tejido óseo maduro no es un tejido estático. A lo largo de la vida, se renueva de forma continua, siendo sustituido en su totalidad cada 7 años aproximadamente en el hombre adulto. Este proceso de remodelado es vital para el mantenimiento del sistema esquelético ya que, como resultado de las tensiones y fuerzas a las que está sometido normalmente, acumula microfracturas que han de ser reparadas. Asimismo, el tejido óseo sólo permanece allí donde es necesario, ya que las zonas no sometidas a tensión mecánica son eliminadas. El remodelado óseo se modula también en función

de la situación endocrina del individuo, como respuesta a las necesidades plasmáticas de calcio y fósforo. Así, la modulación del remodelado óseo es compleja y multifactorial, en la que influyen estímulos mecánicos y microfracturas locales y un número cada vez mayor de señales endocrinas, ya sean las más conocidas, como las hormonas calciotropas [parathormona (PTH), calcitonina,  $1,25(\text{OH})_2\text{-Vit D}_3$ ], hormonas sexuales (estrógenos, andrógenos) o glucocorticoides (GCs); como otras más recientemente descritas en este contexto, como la insulina, la hormona de crecimiento (GH), la leptina o las hormonas tiroideas.

En el proceso de remodelado óseo están implicados los tres tipos celulares citados, osteoclastos, osteoblastos y osteocitos, que se coordinan para formar una unidad de remodelado o unidad básica multicelular (BMU, *basic multicellular unit*). Además, en los últimos años, la vascularización está cobrando también importancia en este contexto, por lo que algunos autores sitúan a los capilares sanguíneos como un componente más de estas unidades [4].

El remodelado óseo comienza cuando células de estirpe osteoblástica que revisten la superficie mineralizada a remodelar (*lining cells*) se retraen, dejando una zona de hueso desnudo para que penetren los osteoclastos en la **fase de activación**. Este proceso parece estar mediado por los osteocitos, que responden a un estímulo mecánico (microfracturas o falta de carga mecánica) o bien por una señalización endocrina que actuaría directa o indirectamente sobre los osteocitos o las células de revestimiento. Posteriormente, en la **fase de resorción**, se produce un reclutamiento de osteoclastos que se polarizan y asocian a la superficie mineralizada, reorganizando su citoesqueleto para formar un anillo de actina que, junto con la expresión de integrinas en la superficie celular, les permitirá adherirse a la matriz ósea y formar una cámara sellada entre la membrana celular y el hueso mineralizado conocida como laguna de resorción o de Howship. La membrana plasmática de estas células desarrolla entonces podosomas, formando un ribete en cepillo característico (*ruffled border*) y, mediante  $\text{H}^+$ -ATPasas, acidifican el medio de estas lagunas para solubilizar los cristales de hidroxapatita. Paralelamente, secretan a la laguna de resorción fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP), encargada de

desfosforilar ciertas proteínas de la matriz y enzimas lisosomales [metaloproteasas, cathepsina K (Cat K)] que degradarán la matriz de colágeno. Mientras realizan esta actividad, los osteoclastos se van desplazando por la superficie del hueso libre de células de revestimiento. Cuando finaliza el proceso de resorción (unos 20 días en humanos), las zonas libres de osteoclastos van siendo colonizadas por los osteoblastos, en una corta **fase de transición**. En esta fase, los osteoclastos activos promueven la diferenciación de los precursores osteoblásticos y entran en apoptosis. Para comenzar la **fase de formación**, las células mesenquimales y de revestimiento precursoras desarrollan un programa de diferenciación celular por el cual adoptan una forma cuboidal y desarrollan abundante retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi polarizados hacia la zona de osteosíntesis. Esta diferenciación está regulada por diversos factores de transcripción, entre los que destacan el factor de transcripción 2 relacionado con RUNT (Runx2) y osterix (OSX), marcadores tempranos de diferenciación osteoblástica. A continuación, tiene lugar la síntesis de osteoide, constituido en su mayor parte por una matriz de colágeno tipo I, en un proceso relativamente rápido (11 días en humanos) seguido de una fase de mineralización más lenta mediada por la fosfatasa alcalina (ALP). Esta enzima secretada hidroliza fosfato orgánico dando lugar a fosfato inorgánico, necesario para la mineralización de la matriz. El proceso de remodelado óseo dura 2-3 meses en humanos. Al final, el 10-30% de los osteoblastos quedarán atrapados en la matriz mineralizada formando los osteocitos [5], otros quedarán sobre la nueva superficie ósea como células osteoblásticas de revestimiento, mientras que la mayoría entrará en apoptosis.

En el hueso maduro sano, el balance del remodelado (la diferencia entre el hueso formado y eliminado) es neutro (igual a 0). La mayoría de las patologías metabólicas óseas tienen como resultado un balance de remodelado negativo (como la osteoporosis, la osteogénesis imperfecta, la osteomalacia, y la enfermedad de Paget), mientras que son menos comunes las patologías asociadas a un balance de remodelado positivo (como la osteopetrosis y la esclerosteosis o enfermedad de Van Buchem) [6].

### 3.3.1 Regulación del metabolismo óseo

El metabolismo óseo se encuentra regulado a nivel endocrino, modulado por diversas hormonas y a nivel local, en respuesta a los estímulos mecánicos. Esta modulación es coordinada por factores locales en el entorno óseo.

#### 3.3.1.1 *Regulación endocrina del metabolismo óseo*

Uno de los factores endocrinos más importantes, la **PTH**, es una hormona esencial en el mantenimiento de la homeostasis fosfocálcica. El papel atribuido tradicionalmente a esta hormona sobre el hueso es el de estimulador de la resorción ósea; en consonancia con su papel calciotrope, ya que estimula directamente la reabsorción tubular de calcio a nivel renal e, indirectamente, a través de la vit D<sub>3</sub> aumenta la absorción intestinal de calcio. Si bien su efecto resorptivo, asociado a un aumento del número y la actividad de los osteoclastos se observa cuando se administra por infusión continua, hoy sabemos que la PTH administrada de forma intermitente tiene efectos anabólicos óseos, aumentando el remodelado con predominio de la formación, debido a una mayor actividad y supervivencia osteoblástica [7]. Así, la modulación del metabolismo óseo de esta hormona es compleja, actuando directamente a través de su receptor 1 (PTH1R) sobre los osteoblastos y, según se ha descrito recientemente, sobre los osteocitos [8, 9].

La **calcitonina** es una hormona secretada por las células parafoliculares de la glándula tiroides. Su acción sistémica es opuesta a la de la PTH, disminuyendo la absorción intestinal de calcio y aumentando su excreción. A nivel óseo, actúa directamente sobre los osteoclastos que poseen receptores para esta hormona en su membrana celular. Esta hormona inhibe directamente la resorción ósea, al disminuir el número y actividad de los osteoclastos [10], aunque también se han descrito efectos antiapoptóticos en osteoblastos [11].

La **1,25(OH)<sub>2</sub>-Vit D<sub>3</sub>** o calcitriol es el metabolito activo de la vitamina D<sub>3</sub> que, además de aumentar la absorción intestinal de calcio y fósforo, actúa sobre la mineralización del tejido óseo, estimulando la síntesis osteoblástica de ALP [12] y de osteocalcina (OC) [13] tras la unión a su receptor VDR en osteoblastos. Estos efectos son dependientes de la diferenciación

osteoblastica, mostrando un descenso en diversos marcadores osteoblásticos cuando la exposición a  $1,25(\text{OH})_2\text{-Vit D}_3$  se hace en estadios tempranos de diferenciación[14].

Las hormonas sexuales, **estrógenos y andrógenos**, son importantes tanto para la maduración del esqueleto en desarrollo como en su mantenimiento en adultos; previniendo de la pérdida de masa ósea asociada a la edad, ya que inhiben la resorción ósea. Se ha demostrado que tanto los osteoclastos como los osteoblastos presentan receptores nucleares para estrógenos y citosólicos para andrógenos [15, 16], por lo que sus efectos antirresortivos podrían ser directos en parte, o bien indirectos, mediados por los osteoblastos, de los que protege de la apoptosis [17-19]. Los efectos de los estrógenos sobre el metabolismo óseo se detallan en el apartado 2.1.

Los efectos catabólicos de los **GCs** sobre el hueso pueden ser directos sobre las células óseas e indirectos, a través de la inhibición de la absorción intestinal de calcio y el aumento de su excreción renal. Estos efectos se detallan en el apartado 1.3.2.

La **insulina** produce un aumento directo de la formación ósea al estimular la síntesis de proteínas de la matriz ósea y favorecer su mineralización. A nivel celular, se han detectado receptores para insulina (IR) en osteoblastos [20], que señalizan a través de los substratos del receptor de insulina (IRS) específicos IRS-1 y IRS-2. Al parecer, el IRS-2 mantiene la dominancia de la formación ósea sobre la resorción, mientras que IR-1 regula el remodelado [21, 22]. Diversos estudios en modelos animales demuestran que la insulina estimula el metabolismo óseo independientemente de otros factores de crecimiento, hormonas o citoquinas [23].

La **GH** es necesaria para el mantenimiento de la masa ósea. Estimula la formación ósea a través de un aumento local del factor de crecimiento relacionado con la insulina 1 (IGF-1), la absorción intestinal de calcio a través del aumento de síntesis de la vitamina D3, así como la mineralización ósea [24].

Las **hormonas tiroideas** son esenciales para el desarrollo normal del cartílago y el hueso endocondral e intramembranoso. Los efectos de la

hormona triyodotironina ( $T_3$ ) sobre el tejido óseo son bifásicos, en el que ejerce efectos anabólicos durante el crecimiento y catabólicos en la etapa adulta. Estos efectos parecen estar mediados, al menos en parte, por el IGF-1. [25].

La **leptina** es una hormona producida fundamentalmente en el tejido adiposo, y tiene una función moduladora en el metabolismo energético promoviendo la lipólisis y actuando como señal de saciedad. Recientemente, se ha demostrado que tiene una función reguladora negativa en el hueso, al estar incrementada la masa ósea de ratones con supresión del gen de la leptina o de su receptor [26, 27]. Sin embargo, su acción es controvertida ya que se ha demostrado *in vitro que es secretada por los osteoblastos, en los que promueve la mineralización* [28].

### 3.3.1.2 Regulación mecánica del metabolismo óseo

El esqueleto, al ser el órgano responsable de dar soporte y protección a los demás tejidos y órganos, ha de ser un tejido adaptativo que responda a las cargas mecánicas externas. Así, ya en 1638, Galileo documentó por vez primera la observación de que la forma de los huesos armoniza con la carga mecánica a la que son sometidos. Hoy sabemos que en ausencia de carga mecánica, se pierde masa ósea, mientras que cuando existe tensión mecánica, la masa ósea se mantiene o incrementa; aunque los mecanismos de estos efectos no son totalmente conocidos [29]. Además, de forma cotidiana, el hueso sufre microfracturas como consecuencia de las cargas e impactos a los que es sometido. Estas áreas microfracturadas son detectadas en el tejido óseo, en el que se inicia localmente el proceso de remodelado para su reparación.

Aunque se ha demostrado que las células de revestimiento, los osteoblastos maduros y los osteocitos responden a estímulos mecánicos [30], éstos últimos -que representan el 95% del total de células óseas- parecen ser los principales reguladores de estas respuestas adaptativas del remodelado óseo; al estar interconectados de forma más o menos homogénea en el interior del tejido óseo calcificado, especialmente en el hueso cortical. Pese a esto, existen pocos datos concluyentes acerca de cómo la tensión mecánica es

detectada por estas células. Una de las teorías más aceptadas para este fenómeno es la existencia de un flujo del medio intersticial en el interior del tejido óseo calcificado, a través de los canalículos y lagunas, provocado por presiones no vasculares y cargas mecánicas, que podría ser detectado por los osteocitos. En cualquier caso, no está claro si los mecanosensores serían los cuerpos celulares de los osteocitos o sus dendritas, que detectarían el flujo por deformaciones de los elementos de anclaje entre la membrana celular y la matriz ósea, que se alterarían por este flujo, o bien cilios presentes en la membrana celular osteocítica [29]. De cualquier modo, tras detectar el estímulo mecánico, los osteocitos producen rápidamente factores tales como NO y prostaglandinas (PGs) y otras moléculas pequeñas que inhiben localmente la resorción y aumentan la formación ósea [31]. En ausencia de estímulos mecánicos, los osteocitos mantienen inhibida la formación ósea mediante la secreción de factores como esclerostina y Dkk1 (proteína Dickkopf 1), inhibidores de las proteínas *wingless-type* (Wnt). Por el contrario, cuando existe una carga mecánica, la producción de estos factores se inhibe [32].

Los osteocitos detectan y transmiten la presencia de una microfractura a través de su apoptosis. Así, se ha demostrado que los osteocitos expresan Bax, proteína proapoptótica, en el área donde ocurre la microfractura, mientras que los circundantes expresan Bcl-2, proteína antiapoptótica. De esta forma, los osteocitos dañados emitirían señales pro-resortivas, mientras que los circundantes quedarían protegidos [33]. Los osteocitos secretan factores de diferenciación osteoclástica, como el ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), en las dendritas, por lo que pueden estimular localmente la diferenciación osteoclástica en la superficie ósea [34].

#### 3.3.1.3 *Factores locales de regulación del remodelado óseo*

Los efectos moduladores sobre el metabolismo óseo están coordinados por numerosos agentes locales, que orquestan la acción de diversas hormonas y estímulos mecánicos sobre las células óseas.



Los **IGFs** son unos de los factores de crecimiento más abundantes en el esqueleto. Se encuentran formando complejos, unidos a diversos tipos de proteínas fijadoras sintetizadas por los osteoblastos (IGFBPs) que controlan su biodisponibilidad. Sus dos isoformas, IGF1 y IGF2, poseen actividad anabólica, especialmente el IGF1, cuya síntesis es regulada por la GH y la PTH [24, 35]. El IGF1 es secretado por los osteoclastos y los osteoblastos y regula la formación ósea, induciendo la diferenciación osteoblástica a través del factor de transcripción OSX [36].

El **TGF- $\beta$**  es un factor producido por los osteoblastos, con efectos autocrinos, estimulando el reclutamiento y la proliferación y diferenciación osteoblástica. Promueve la deposición de proteínas de la matriz y la expresión de Runx2; mientras que inhibe el receptor activado de proliferación de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), un factor de diferenciación adipocítico [37]. En osteoclastos, parece promover la osteoclastogénesis *in vitro* y la resorción ósea *in vivo* aumentando su sensibilidad para RANKL [38].

Las **proteínas morfogenéticas del hueso** (BMPs) son proteínas de la familia del TGF- $\beta$  producidas por los osteoblastos, en los que modulan su reclutamiento y diferenciación temprana. La BMP-2 activa la diferenciación osteoblástica a través de los factores de transcripción Runx2 y OSX [36], actuando tanto en osteoblastos como en las células mesenquimales precursoras [39].

Las **PGs**, especialmente la E<sub>2</sub>, son también abundantes en el hueso, donde las producen los osteoblastos. Poseen efectos bifásicos tanto en la formación como en la resorción, estimulando el desarrollo de osteoblastos y osteoclastos e inhibiendo a ambos tipos celulares maduros [40].

Los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGFs), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) estimulan la replicación y diferenciación de las células óseas. El VEGF es secretado por vasos sanguíneos y osteoblastos y parece tener un importante papel en la diferenciación osteoblástica del hueso en regeneración [41]; mientras que el PDGF está asociado a procesos de inflamación y la familia FGF tiene efectos sobre la proliferación y diferenciación osteoblástica y condrocítica a través de Runx2 [42].

Las proteínas **Wnt** han cobrado recientemente un importante papel en la diferenciación osteoblástica. Wnt3a y Wnt10 parecen ser las que ejercen mayores efectos sobre las células óseas, activando la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, ya que potencian la osteoblastogénesis en detrimento de la adipogénesis de las células precursoras mediante la modulación de Runx2 y PPAR $\gamma$ , respectivamente [43, 44].

Durante el proceso de remodelado, las células óseas mantienen una íntima comunicación entre sí. Estos mecanismos de comunicación son complejos y en muchos casos redundantes. Como hemos mencionado en el apartado 1.3, una de las etapas más reguladas de este proceso es la **fase de activación**, en la que los osteocitos activan a las células de revestimiento, normalmente quiescentes y/o a los precursores osteoclásticos. Esta activación tiene lugar como respuesta a un estímulo mecánico o bien mediante la acción de un agente endocrino sobre los osteocitos o las células de revestimiento. A este respecto, recientemente se ha demostrado que los osteocitos responden a PTH, al parecer un efecto clave en la acción anabólica ósea de esta hormona [8, 45]. Así, mediante diversas señales de comunicación (detalladas en 1.3.1.2), los osteocitos provocan la retracción y diferenciación de las células de revestimiento, exponiendo el hueso al medio. Ciertos autores defienden la idea de que los osteoclastos, células de la estirpe monocito-macrófago del sistema inmune, reconocen al hueso mineralizado desnudo como un material “extraño”, por lo que proceden a su resorción de un modo similar a como lo hacen los fagocitos ante partículas extrañas. Así, el desprendimiento de las células de revestimiento del hueso sería suficiente para la activación de los osteoclastos [46].

La **fase de resorción** se inicia a través de la comunicación entre los osteoblastos y los osteoclastos, ya sea a través de factores secretados o por contacto celular [47]. El mecanismo más documentado implica al eje formado por la OPG (osteoprotegerina) y el RANKL, ambos expresados en osteoblastos. El RANKL pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y tiene gran afinidad por RANK, receptor presente en la membrana del osteoclasto. Este factor se expresa en la superficie osteoblástica (isoformas 1 y 2) o bien es secretado (isoforma 3) y es un potente activador de la

diferenciación osteoclástica. La OPG es una proteína soluble similar a RANK (pertenece a la misma familia de receptores de TNF) y es secretada por el osteoblasto al medio extracelular. La OPG presenta gran afinidad por RANKL, actuando como un receptor señuelo, capturándolo en el medio extracelular e impidiendo su unión a RANK y por tanto, la activación osteoclástica (Fig. 1). Así pues, a través de la relación OPG/RANKL, regulada por diversos factores sistémicos y locales, los osteoblastos modulan la actividad osteoclástica. De hecho, esta relación se considera actualmente como un marcador de balance de remodelado óseo. De hecho, recientemente se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal contra RANKL (Denosumab®) para inhibir la resorción ósea en situaciones de aumento del remodelado óseo que se encuentra en fase de investigación clínica avanzada [48].

Posteriormente, en las **fases de transición y formación**, los osteoclastos parecen jugar un papel fundamental en el acoplamiento de las células osteoblásticas a la laguna de resorción [49]. Uno de los mecanismos de comunicación osteoclasto-osteoblasto podría ser por contacto directo célula-célula a través de las efrinas y sus receptores (Eph). Se ha demostrado que los osteoclastos expresan efrina B2, que interactúa con el receptor EphB4, presente en los precursores osteoblásticos. Como fruto de esta interacción, en el osteoclasto se bloquea el factor de transcripción c-Fos, inhibiéndose la osteoclastogénesis, mientras que se promueve la osteoblastogénesis [47]. Por otro lado, la liberación durante la resorción osteoclástica de factores atrapados en la matriz ósea, parece ser importante en la activación de la formación ósea. Esto se puso de manifiesto originalmente al observar la alta capacidad mitogénica del polvo de hueso liofilizado bovino sobre fibroblastos en cultivo [50]. Estos factores son elaborados y secretados por los osteoblastos durante la etapa de formación y constituyen en torno a un 10% del componente proteico de la matriz. Aunque suelen estar relacionados funcionalmente con la integridad de la matriz, a menudo estos factores tienen además una función señalizadora durante la osteoformación o al ser liberados posteriormente durante la fase de resorción. Entre otros factores, la OC es una proteína con residuos Gla (γ-glutamil di-carboxílico) que potencian la mineralización nucleando la formación de cristales de hidroxiapatita sobre las fibras de

colágeno, aunque posiblemente regula también la actividad y diferenciación osteoclásticas. La OC se utiliza como marcador de formación ósea ya que un 10-25% se libera al torrente sanguíneo durante esta fase de formación [51]; hoy en día se le atribuye además un papel como reguladora endocrina de la secreción de insulina [52]. La osteonectina es un mediador de la deposición de hidroxiapatita sobre el colágeno que podría estimular también la formación ósea, uniéndose a otros factores de crecimiento y actuando sobre el ciclo celular de los osteoblastos para aumentar su proliferación [53]. La osteopontina, que pertenece a una familia de proteínas pequeñas de unión a integrinas, favorece el reconocimiento y unión de las células a la matriz mineralizada y parece regular además la proliferación celular e inhibir la actividad NO sintetasa [54]. En la matriz ósea quedan atrapados también factores de crecimiento como IGF1, BMPs y TGF $\beta$ . Además, se ha demostrado que proteínas osteoclásticas como TRAP y Cat K, implicadas en el proceso de resorción, podrían también modular el proceso de formación [47].

### **3.4 Papel de la proteína relacionada con la PTH (PTHrP) en el hueso**

La PTHrP fue identificada en la década de los 80 en pacientes con hipercalcemia humoral de origen tumoral [55, 56]. La sobreexpresión de esta proteína en distintos tipos de cancer, fundamentalmente en el carcinoma de mama, le confiere efectos endocrinos; siendo detectable en suero y responsable del incremento de la resorción ósea y la reabsorción tubular de calcio observadas en estos pacientes. En condiciones normales, sin embargo, la PTHrP es un factor local presente en una gran variedad de tejidos y tipos celulares en los que ejerce acciones autocrinas, paracrinas o intracrinas sobre la diferenciación y/o supervivencia celular [57]. En el entorno óseo, la PTHrP es sintetizada por los osteoblastos y condrocitos, y juega un papel importante en el desarrollo del hueso endocondral y como regulador del metabolismo óseo en adultos [57, 58]. De hecho, la supresión homocigótica del gen de la PTHrP genera una condrodisplasia letal perinatal en el ratón; mientras que los

animales con delección heterocigótica de este gen son viables pero muestran una reducción significativa de la masa ósea [59].

Evolutivamente, el gen de la PTHrP proviene de un ancestro común a la PTH, con la que conserva una gran homología estructural. Ciertos autores creen que el gen original sería muy similar al de la PTHrP, y sitúan su aparición en los primeros protovertebrados del Cámbrico, hace 450-500 millones de años [60]. El gen de la PTH, como hormona calciotropa producida en una glándula especializada (paratiroides), se generaría posteriormente, en los primeros anfibios, por duplicación cromosómica. Estos datos están apoyados por la similitud nucleotídica de las regiones cromosómicas que rodean a ambos genes [61] y por el hecho de que la PTHrP se ha localizado en peces teleósteos, carentes de glándula paratiroides, en los que es la principal proteína calciotropa [62].

En humanos, el gen de la PTHrP está situado en el brazo corto del cromosoma 12 y es mucho más complejo que el de la PTH. Su expresión está regulada por 2 silenciador y 3 regiones promotoras, dos cajas TATA y uno rico en GC, y contiene en total 8 exones [63]. Esto le permite generar, por procesamiento alternativo, tres isoformas proteicas de 139, 141 ó 173 aminoácidos (Fig. 2). La expresión de la PTHrP se regula por una diversidad de agentes que actúan a través de receptores nucleares (glucocorticoides, 1,25-OH Vit D<sub>3</sub>, 17β-estradiol), o de membrana, acoplados a tirosina quinasa (TGFβ, EGF) o a proteínas G (angiotensina II, vasopresina) en diversos tipos celulares [61]. El ARNm de la PTHrP es muy inestable, al poseer numerosos bases de uracilo en la región 5' de poliadenina, lo que determina su baja concentración intracelular [63].

En las 3 isoformas de la PTHrP, el extremo N-terminal está precedido de un dominio transmembrana de 36 aminoácidos que determina su tráfico hasta el retículo endoplasmático rugoso. Los aminoácidos -2 y -1 de este dominio pre-proteico, que quedan en la base del anclaje de la proteína a la membrana,

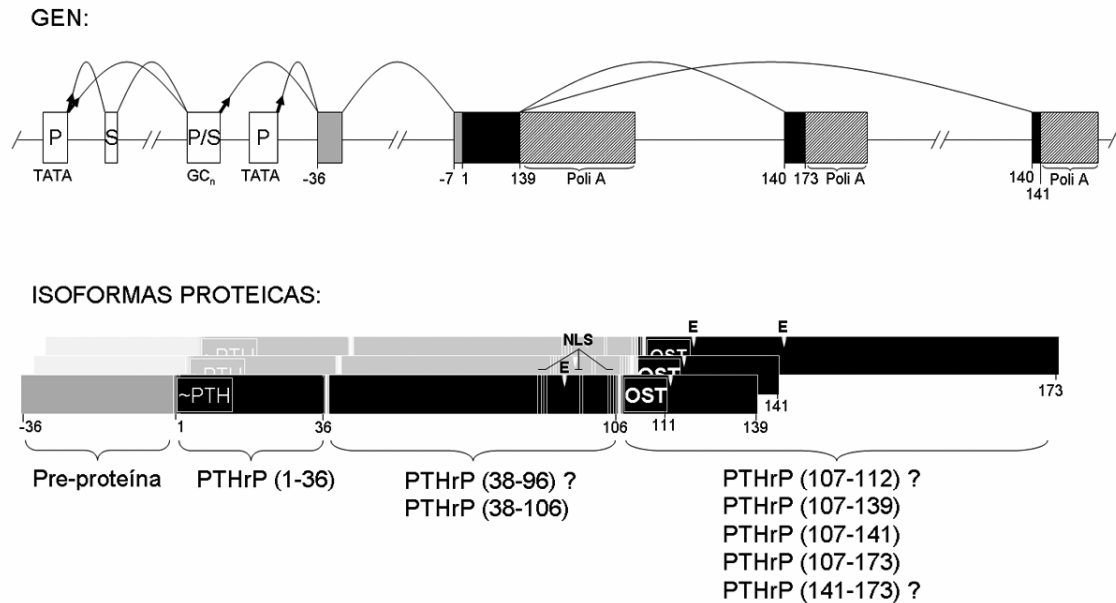


Figura 2. Organización del gen de la PTHrP humana y su procesamiento post-traduccion. El gen de la PTHrP se encuentra en el brazo corto del cromosoma 12. Contiene 8 exones, de los cuales 4 no son transcritos, constituyendo 3 promotores (P) y dos silenciadores (S). El procesamiento alternativo del gen da lugar a tres isoformas de la PTHrP de 139, 141 ó 173 aminoácidos. Por procesamiento post-traduccion se generan tres tipos de fragmentos, el N-terminal, o PTHrP (1-36), similar a la PTH; la zona media, PTHrP (38-106), con secuencias de localización nuclear (NLS), que podría comprender sólo hasta el aminoácido 96 si se proteoliza en los aminoácidos reconocibles por endopeptidasas (E); y el C-terminal, que contiene la región de 5 aminoácidos 107-111, *Osteostatina* (OST), que podría liberarse en un posible fragmento PTHrP (107-112), y una región en la isoforma más larga de la PTHrP, entre los aminoácidos 141 y 173, que podría ser liberado.

son dianas de corte de endoproteasas en la luz del retículo, por lo que el destino de esta proteína es, en principio, la secreción.

Cualquiera de las tres isoformas posee tres dominios principales, el N-terminal, la región media y el C-terminal. **El dominio N-terminal**, que comprende los aminoácidos 1-36, presenta homología con la PTH (por su composición aminoacídica entre los aminoácidos 1 y 13 y estructural del 14 al 36). Este fragmento, originado por acción de endopeptidasas entre los aminoácidos 36 y 38, es secretado e interacciona con el receptor PTH1R. Estudios recientes indican que aunque la PTH y la PTHrP interaccionan con este receptor, las vías intracelulares activadas respectivamente podrían ser diferentes [64]. Aunque este fragmento tiene una reconocida función anabólica en el hueso, estimulando fundamentalmente la formación ósea [65-68], los posibles mecanismos asociados a su acción osteogénica son actualmente desconocidos.

**La región media**, comprendida entre los aminoácidos 38 y 106 (tras el que existe otra secuencia sensible a endopeptidasas), tiene una función y tamaño exacto desconocidos. Además, podría ser transportado al núcleo y ejercer acciones intracrinas, ya que posee secuencias de localización nuclear (NLS) entre los aminoácidos 87 y 106. De hecho, recientemente se ha descrito una posible traducción alternativa de la PTHrP, a partir de codones CUG situados en la secuencia correspondiente a la pre-proteína, que liberaría a la proteína de la secuencia de enclave al retículo endoplásmico, facilitando su transporte al núcleo [69, 70].

Por otro lado, el **dominio C-terminal** de la PTHrP, que confiere la diferencia a las 3 isoformas de la proteína, comprende los aminoácidos 107-139, 107-141 ó 107-173, en función de la isoforma. De esta región, los fragmentos 107-112 y 107-139, limitados por aminoácidos básicos que podrían ser reconocidos por endopeptidasas [71], son potentes inhibidores de la actividad osteoclástica [72-76]. De hecho, el pentapéptido 107-111 de la PTHrP, una secuencia altamente conservada entre especies, resultó efectivo para inhibir la resorción de osteoclastos de rata a dosis tan bajas como  $10^{-15}$ M, lo que llevó a denominarlo osteostatina [72]. Además, ambos péptidos C-terminales de la PTHrP también afectan a la diferenciación y supervivencia osteoblásticas, al parecer a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC); aunque aún no se ha logrado aislar un receptor para esta región C-terminal de la PTHrP, estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado una transactivación del receptor 2 del VEGF (VEGFR2) asociada a la acción anti-apoptótica de la PTHrP (107-139) en los osteoblastos [77-79].

Por otra parte, se ha detectado inmunoreactividad para la región 141-173 en el carcinoma de próstata, la leche o el líquido amniótico humanos; indicando la presencia de este posible fragmento, formado a partir de una de las tres isoformas de la PTHrP, pero cuyas acciones son desconocidas [80, 81].

## 4 Osteoporosis

La osteoporosis se ha definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la “patología ósea presente en individuos con una densidad mineral ósea (DMO) inferior al valor promedio correspondiente a la población adulta joven en 2,5 veces la desviación estandar (DE)” [82]. La osteoporosis describe un proceso patológico óseo caracterizado por una baja masa ósea y un deterioro en su microarquitectura, que conlleva a una mayor fragilidad ósea y riesgo de fractura. La OMS establece así una serie de criterios densitométricos para el diagnóstico de la osteoporosis (ver tabla 1).

Tabla 1: Criterios densitométricos para el diagnóstico de la osteoporosis.

Nivel de DMO respecto a la población adulta joven	
<b>Hueso normal</b>	DMO entre +1 y -1 DE
<b>Osteopenia</b>	DMO entre -1 y -2,5 DE
<b>Osteoporosis</b>	DMO inferior a -2,5 DE
<b>Osteoporosis grave</b>	DMO inferior a -2,5 DE y una o más fracturas de tipo ostoporótico

Aunque ya en los comienzos del siglo XIX, el cirujano inglés Sir Astley Cooper observó un descenso en la masa ósea de los pacientes de edad avanzada, el término osteoporosis no fue acuñado hasta 1830 por el patólogo francés Jean Lobstein, al observar en determinadas biopsias un hueso normalmente mineralizado pero con zonas vacías más abundantes de lo habitual. En 1940, el endocrinólogo americano Fuller Albright asoció por primera vez la pérdida de masa ósea con el descenso de la producción estrogénica en mujeres postmenopáusicas, y en 1984 se propuso la distinción entre la osteoporosis postmenopáusica y la provocada por el envejecimiento [83].

Desde mediados del siglo pasado, la osteoporosis se ha convertido en un problema de gran relevancia biomédica debido al incremento de la longevidad media y a los cambios en el estilo de vida de la población mundial. Esta patología afecta a un tercio de las mujeres postmenopáusicas y a la



mayoría de los ancianos, constituyendo una población de 75 millones de personas en EEUU, Europa y Japón [84]. Los datos actuales, tanto experimentales como clínicos, indican que la osteoporosis está causada por una compleja interacción de factores locales y sistémicos que afectan a la función de las células óseas y conduce a la pérdida y/o al deterioro de la masa ósea (tabla 2).

Tabla 2: Principales factores de riesgo de la osteoporosis.

<b><u>No Modificables</u></b>	<b><u>Enfermedades Asociadas</u></b>	<b><u>Modificables (Hábitos)</u></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sexo femenino</li> <li>• Edad avanzada</li> <li>• Etnia caucásica o asiática</li> <li>• Historial de fracturas</li> <li>• Historial de fracturas en familiares de primer grado (especialmente fractura de cadera en la madre o el padre)</li> <li>• Menopausia temprana</li> <li>• Complexión delgada y ligera</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetes mellitas</li> <li>• Síndrome de Cushing</li> <li>• Celiaquismo</li> <li>• Hiperparatiroidismo</li> <li>• Artritis reumatoide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bajo peso corporal</li> <li>• Deficiencia de hormonas sexuales (estrógenos, testosterona)</li> <li>• Terapia crónica con ciertos medicamentos (glucocorticoides, quimioterapia)</li> <li>• Dieta (baja ingesta de calcio, vitamina D)</li> <li>• Tabaquismo</li> <li>• Alcoholismo</li> <li>• Sedentarismo</li> <li>• Desórdenes alimenticios (anorexia, bulimia)</li> </ul>

Epidemiológicamente, la osteoporosis se clasifica en primaria, ya sea postmenopáusica, senil o idiopática; y secundaria, asociada a un exceso de GCs, diabetes (especialmente la tipo 1), patologías gastrointestinales, hiperparatiroidismo o fracaso renal, entre otras causas. De estas últimas, el exceso de GCs se ha convertido en la causa más frecuente, alcanzando al 25% de todos los casos de osteoporosis, debido a su elevada prescripción en la práctica clínica.

## 4.1 Osteoporosis postmenopáusica

La causa de la osteoporosis postmenopáusica es la interrupción en la producción de estrógenos por las gónadas. Así, sus niveles en mujeres postmenopáusicas están inversamente relacionados con el riesgo de fracturas osteoporóticas, y el reemplazo hormonal previene la pérdida de masa ósea [85].

En contra de la hipótesis inicial de Albright, este tipo de osteoporosis no se debe a un descenso de formación ósea, sino al incremento del remodelado con un componente resorptivo preponderante. Esto sugiere que la función de los estrógenos en el hueso es la de balancear el remodelado óseo, disminuyendo el recambio óseo [86]. Los niveles de estrógenos son también importantes para el mantenimiento de la masa ósea en varones, ya que su función es crítica en ambos sexos para la calcificación y fusión de la placa de crecimiento en los huesos largos, y los bajos niveles de estrógenos se asocian también con la osteoporosis senil en varones [18].

Ambos receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  (ER $\alpha$  y ER  $\beta$ ) se expresan en osteoblastos, osteoclastos y osteocitos, aunque el ER $\alpha$  parece ser el principal mediador de las acciones moduladoras de los estrógenos sobre el remodelado óseo [87]. Los efectos de los estrógenos a nivel celular están mediados por la interacción directa del complejo estrógeno-receptor con elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el ADN, o bien con factores intracelulares como NF- $\kappa$ B o la quinasa de Jun N-terminal (JNK) para modular la actividad transcripcional. En osteoclastos, los estrógenos aumentan la apoptosis, e inhiben la expresión de MC-SF y de los receptores de interleuquina (IL)-6 y RANKL [18]; mientras que ejercen efectos protectores frente a la apoptosis en los osteoblastos [19], en los que estimulan la síntesis de TGF $\beta$  e IGFBPs, activadores de la formación ósea, y de OPG, inhibidor de la osteoclastogénesis [18]. En una situación de déficit estrogénico, la ausencia de estrógenos provoca un incremento de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-7, que aumentan la formación de osteoclastos y reducen su apoptosis, aumentando el número de BMUs. En esta situación, se ha observado un incremento temprano de la formación ósea, aunque transitoria e insuficiente para compensar el grado de resorción debido al mayor nivel de apoptosis osteoblástica [87].

## **4.2 Osteoporosis inducida por exceso de GCs (GIO)**

La pérdida de masa ósea por exposición a dosis elevadas de GCs se conoce desde que fuera descrita por Cushing en 1932 en pacientes con tumores hipofisarios causantes de hiperplasia suprarrenal [88]. Sin embargo, este hecho no ha merecido suficiente atención hasta que los GCs empezaron a ser utilizados por vía exógena, hace más de 50 años.

Hoy en día, los GCs son ampliamente utilizados por sus efectos antiinflamatorios en trastornos crónicos como el asma o la artritis reumatoide, e inmunosupresores en alergias o para evitar el rechazo de órganos transplantados; su administración oral se asocia a un aumento del riesgo de fractura de columna y cadera [89] y a una disminución de la DMO [90]. El grado de pérdida de masa ósea está íntimamente relacionado con la dosis y duración de la terapia con GCs, siendo suficiente una exposición prolongada a dosis moderadas para aumentar el riesgo de fracturas [91]. De este modo, la incidencia de osteoporosis inducida por GCs (GIO) constituye hasta un 50% en pacientes tratados de forma crónica durante más de 6 meses, de los cuales la mitad acaban sufriendo una fractura osteoporótica [92-94]. El tratamiento crónico con GCs orales alcanza al 0,5% de la población total y al 1,7% de las mujeres postmenopáusicas, aunque sólo un 14% de estos pacientes reciben un tratamiento preventivo de osteoporosis [95].

Los GCs ejercen también efectos indirectos sobre el metabolismo óseo, ya que inhiben la absorción de calcio a nivel intestinal y aumentan su excreción urinaria. Además, disminuyen la secreción de hormonas sexuales (fundamentales para el mantenimiento de la masa ósea) [95] y originan un deterioro de la masa muscular, que conlleva a la pérdida de su efecto trófico sobre el hueso y a un incremento en la inestabilidad y riesgo de caídas [90, 93, 96]. Sin embargo, sus principales efectos sobre el metabolismo óseo son directos, ya que alteran el remodelado óseo y reducen la formación de hueso hasta en un 30% [94]. Estos efectos están asociados, en una primera fase, a un aumento de la resorción ósea acompañada de una disminución de la actividad osteoblástica; manteniéndose posteriormente la supresión de la

formación ósea como efecto predominante e inhibiéndose parcialmente la resorción osteoclástica, lo que genera un balance negativo de remodelado óseo durante el tratamiento prolongado con GCs [94].

Los efectos tempranos de los GCs sobre la resorción ósea son debidos a un aumento en la actividad y viabilidad osteoclásticas, causado tanto por una acción directa sobre este tipo celular [97] como por una disminución de la expresión de OPG y un aumento de la expresión de RANKL por los osteoblastos [98, 99]. Sin embargo, se ha observado *in vitro* que, además de sus efectos antiapoptóticos, la administración de GCs provoca una disminución de la proliferación de precursores osteoclásticos; por lo que la osteoclastogénesis no parece estar implicada en el aumento temprano de resorción [98, 100].

En cuanto a los efectos de los GCs sobre la formación ósea, éstos afectan a la supervivencia de osteoblastos y osteocitos, como se ha demostrado en diversos modelos *in vitro* e *in vivo* [11, 19, 101-103]. Se ha observado que esta acción es directa y no mediada por una alteración en los niveles de hormonas sexuales o de absorción/excreción de calcio, ya que la sobreexpresión *in vivo* en osteoblastos y osteocitos de la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2, que inactiva a los GCs, protege a estas células de la apoptosis inducida por estos compuestos [103]. Otros estudios, sin embargo, destacan el papel mediador de los osteoclastos en este proceso [104]. Los GCs afectan también a la diferenciación osteoblástica, inhibiendo la transcripción de diversos factores, como el colágeno tipo 1, la OC y la ALP, así como de factores de señalización locales como IL-1 e IL-6, IGF-I y II y las IGFBP-3, 4 y 5 [105]. Los GCs inhiben también la expresión de PTHrP en los osteoblastos [106, 107], al igual que el sistema VEGF [108].

### **4.3 Modelos *in vivo* de pérdida de masa ósea**

Existe un cierto número de modelos *in vivo* para estudiar la fisiopatología de la osteoporosis y los efectos de posibles agentes osteoformadores en esta situación.

Para estudiar la osteoporosis postmenopáusica, existen modelos de depleción estrogénica por **ovariectomía (OVX)**. En este tipo de modelos, llevados a cabo normalmente en ratones y ratas, suelen ser suficientes 4 semanas post-OVX para desarrollar una pérdida de masa ósea significativa [109]. Aunque tradicionalmente se ha utilizado más la rata en este tipo de modelos (por su mayor tamaño relativo), los avances en la precisión de los sistemas de medida de densidad y estructura óseas, así como la posibilidad de manipulaciones genéticas, han facilitado la utilización de ratones.

Los modelos de **inmovilización**, que provocan una pérdida de masa ósea por ausencia de estímulos mecánicos, resultan muy útiles para estudiar el papel de la mecanotransducción en el hueso. Provocan diferencias significativas en el hueso trabecular entre 14 y 30 días, observándose a tiempos más largos también en el hueso cortical [110]. Estos modelos suelen implicar una intervención quirúrgica para la resección de un nervio o tendón, o bien se inmoviliza una extremidad o se cuelga al roedor por la cola de forma que sólo pueda utilizar las extremidades anteriores.

Los modelos de tratamientos con **GCs**, especialmente en ratones, tienen la ventaja de que mimetizan los efectos de la GIO en humanos, mostrando una disminución de la DMO, del número de osteoblastos y de osteoclastos y un aumento de la apoptosis osteoblástica y osteocítica [111]. Estos cambios se observan además a tiempos cortos, lo que presenta ventajas para el diseño experimental.

Existen también modelos de osteoporosis senil, en los que se utilizan ratones de la cepa de envejecimiento prematuro **SAM/P6** (*Senescence accelerated Mouse P6*). Estos animales desarrollan un hueso normal durante las primeras 12 semanas, tras las cuales desarrollan una osteopenia progresiva. En esta cepa, se ha descrito una disminución de la osteoblastogénesis a costa de una desviación de las células precursoras hacia la línea adipogénica, como ocurre en la osteoporosis senil humana [87].

En general, los modelos en ratón tienen la ventaja de necesitar dosis menores de agonistas, y el hueso tiene un comportamiento similar al humano en ausencia de estrógenos, por lo que son de gran utilidad para realizar los ensayos iniciales de un posible agente osteoformador. Por otro lado, tanto en

ratones como en ratas, son poco frecuentes las osteonas en el hueso cortical, por lo que el remodelado en este tipo de tejido no es tan similar al de humanos [1]. Así, la Food and Drug Administration (FDA) americana requiere que antes de iniciar un ensayo clínico para tratar la osteoporosis en humanos se haya demostrado la eficacia del agente utilizado en un modelo experimental en animales pequeños y posteriormente, en otros de peso mayor y con un hueso cortical con sistema haversiano, siendo el perro el animal más utilizado [112, 113]. Sin embargo, en la DMO y comportamiento mecánico, el hueso humano no se asemeja al de otros mamíferos no primates, por lo tanto hay que tener en cuenta no existe un modelo perfecto en este sentido [113].

## **4.4 Tratamientos de la osteoporosis**

### **4.4.1 Tratamientos no farmacológicos**

La osteoporosis es una patología que responde positivamente a la modificación del estilo de vida. Así, el control de un excesivo consumo de alcohol, tabaco y cafeína puede tener efectos beneficiosos sobre la masa ósea [114]. Además, el suplemento de calcio y vitamina D en la dieta están recomendados para retrasar la pérdida de masa ósea, y la práctica de un ejercicio físico moderado se ha comprobado que aumenta hasta un 5% la DMO en mujeres postmenopáusicas [115].

### **4.4.2 Estrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERMs)**

La terapia de reemplazo estrogénico en mujeres postmenopáusicas tiene efectos beneficiosos sobre la masa ósea, aunque no son tan patentes si se comienza pasados los 5 primeros años desde la menopausia [85]. Además, el uso de estrógenos puede aumentar el riesgo de cáncer de mama o de útero, de enfermedades cardíacas y derrame cerebral, en personas con predisposición genética a desarrollar estas patologías; aunque se ha demostrado que la dosis de estrógenos necesaria para revertir la pérdida de

masa ósea en mujeres osteoporóticas es la cuarta parte de la que haría falta para estimular la mama o el útero [116, 117].

Los SERMs son compuestos sintéticos que actúan como agonistas o antagonistas de los estrógenos, ejerciendo efectos distintos en los diferentes tejidos que responden a estas hormonas. Así, el tamoxifeno actúa como agonista de los estrógenos sobre la mama, previniendo el desarrollo de tumores en mujeres postmenopáusicas, mientras que actúa como antagonista de los estrógenos en el útero [118]. El raloxifeno actúa sobre los receptores estrogénicos óseos inhibiendo la producción de citoquinas pro-resortivas, y evitando la pérdida de masa ósea a nivel vertebral, aunque se han observado ciertos efectos secundarios sobre el metabolismo del colesterol [119].

#### **4.4.3 Bifosfonatos**

Los bifosfonatos son compuestos sintéticos estables, análogos al pirofosfato, formados por un esqueleto P-C-P más dos residuos variables en el carbono. Hoy en día son los agentes más comúnmente utilizados para prevenir y tratar la osteoporosis.

Sintetizados por primera vez a mediados del siglo XIX, eran utilizados industrialmente como anticorrosivos, ya que su estructura molecular impide la formación de precipitados cálcicos. A principios de 1960, se descubrieron las propiedades inhibitorias de la calcificación del pirofosfato en los fluidos corporales, demostrándose estos mismos efectos inhibitorios sobre la mineralización ósea. Más adelante, se hizo patente que los bifosfonatos también inhiben la disolución de los cristales de hidroxiapatita, lo que incitó a investigar sus posibles actividades antirresortivas [120].

El hecho de que tanto el pirofosfato como los bifosfonatos inhiban el crecimiento y la disolución de los cristales de hidroxiapatita se debe a que estos compuestos presentan una fuerte afección por ésta. Así, en el entorno óseo los bifosfonatos quedan íntimamente asociados a la superficie mineralizada expuesta al medio, inhibiendo la actividad osteoclástica. Aunque en un principio se creía que los bifosfonatos impiden la adhesión física de los osteoclastos al hueso y, por tanto, la formación de la laguna de resorción, hoy

sabemos que los osteoclastos se pueden unir al hueso en presencia de bifosfonatos, actuando éstos sobre su metabolismo celular. Al formar la laguna de resorción, los osteoclastos acidifican el medio, liberando a los bifosfonatos adheridos al hueso, que alcanzan concentraciones de hasta 1 mM, siendo entonces internalizados por endocitosis por los osteoclastos, en los que bloquean diversos mecanismos intracelulares y provocan su apoptosis.

Existen varias generaciones de bifosfonatos, según qué residuos laterales estén presentes en el grupo carbono central. La última generación de bifosfonatos la componen el zolendronato y el risedronato, en los que uno de los residuos laterales unidos al C central está formado por un anillo heterocíclico nitrogenado. Estos bifosfonatos son hasta 10.000 veces más potentes que los de la primera generación, al mostrar una mayor afección por la hidroxiapatita. Tienen la propiedad de que tras ser internalizados por los osteoclastos, se pueden reciclar para volver a asociarse a la superficie ósea. Este hecho permite que, al menos el zolendronato, se haya mostrado eficaz en prevenir la pérdida de masa ósea durante un año con una única administración intravenosa [121]. Otros estudios proponen un posible efecto protector de la apoptosis sobre los osteoblastos [11]. Como efecto negativo, su potente acción inhibitoria de la actividad osteoclástica, puede determinar la supresión del remodelado óseo, generando un hueso adinámico. Esto puede conllevar a un aumento en la fragilidad ósea por acumulación de microfracturas, como han demostrado algunos estudios *in vivo* [122, 123].

#### **4.4.4 PTH**

Aunque las acciones anabólicas de la PTH se comenzaron a estudiar en profundidad a partir de 1970, tras la síntesis del fragmento 1-34, sus efectos anabólicos óseos se describieron ya hacia 1930, en ratas y perros inyectados diariamente con extracto purificado de paratiroides. Al ir en contra de la opinión establecida de la PTH como hormona calciotropa, estos resultados fueron ignorados por la comunidad científica [124]. Desde su aprobación por la FDA en EEUU en 2002, y en Europa en 2004, la PTH (1-34) recombinante humana, (*teriparatide*), es el único agente anabólico óseo disponible para su uso clínico. Ha demostrado disminuir el riesgo de fractura hasta en un 65% en pacientes



osteoporóticos cuando se administra de forma intermitente (una inyección al día), aumentando considerablemente la masa ósea tanto a nivel vertebral como apendicular [125].

La PTH ejerce sus acciones anabólicas en el hueso sobre células de la línea estromal y osteoprogenitora, que expresan receptores PTH1R en todas sus etapas de diferenciación. En administración intermitente, la PTH estimula la diferenciación osteoblástica de estas células y de las células de revestimiento y disminuye su apoptosis, provocando un incremento neto en la formación ósea. Estos efectos parecen estar mediados por la activación de factores de transcripción como Runx2 y c-Fos [126] y por la estimulación de IGF1 y de TGF $\beta$  [127, 128], con efectos positivos sobre la proliferación y diferenciación de las células del linaje osteoblástico. Recientemente, se ha destacado la posible mediación de los osteocitos en dichas acciones anabólicas, al inhibir la PTH la secreción de esclerostina, activando así la diferenciación de las células de revestimiento [8].

La PTH, sin embargo, tiene efectos opuestos en el hueso cuando se administra de forma continua, aumentando el número de BMUs con un componente preponderante de la resorción. Este efecto también está mediado por los osteoblastos, a través de un mecanismo que parece implicar una disminución de la expresión de OPG, un mayor número de IGFBPs -que limitarían la cantidad de IGF1 disponible- y un aumento de IL-6 e IL-11, con efectos osteoclastogénicos [129].

#### **4.4.5 Calcitonina**

La calcitonina es una hormona con receptores en la superficie osteoclástica que inhibe directamente su actividad. Presenta una característica única respecto a los demás tratamientos citados, al poseer propiedades analgésicas (disminuye el dolor óseo), por lo que constituye el tratamiento adecuado para aquellos pacientes que han sufrido una fractura osteoporótica. Aunque detiene la pérdida de masa ósea tanto a nivel vertebral como femoral, este efecto parece afectar sólo al hueso trabecular, y sus efectos sobre el riesgo de fracturas son controvertidos [130].

#### 4.5 La PTHrP como posible agente osteogénico en la osteoporosis

Se han evaluado los efectos anabólicos óseos del fragmento N-terminal de la PTHrP en ratas ovariectomizadas y en mujeres postmenopáusicas. En el modelo animal, se han obtenido resultados positivos sobre la masa ósea con tan sólo 13 días de tratamiento [65], y su administración intermitente durante 6 meses aumentó tanto la DMO como los parámetros histomorfométricos de formación ósea, y las propiedades biomecánicas del hueso cortical y trabecular; aunque de modo menos eficaz que la PTH (1-34) [67]. Esta menor eficacia de la PTHrP (1-36) respecto a la PTH (1-34) se interpreta como consecuencia de la distinta farmacocinética de ambos péptidos. En mujeres postmenopáusicas, una dosis de 400 µg/día de PTHrP (1-36) durante 12 semanas indujo un aumento de OC y una disminución de derivados peptídicos del colágeno tipo 1, marcadores de resorción ósea; asociados a un aumento del 5% en la DMO de la columna lumbar [66]. Este efecto osteoformador es elevado y rápido, en comparación al observado con las terapias clásicas antiresortivas (bifosfonatos).

Por otra parte, además de los datos *in vitro* que sitúan al fragmento C terminal de la PTHrP como un potente inhibidor de la resorción ósea mediada por los osteoclastos (descritos en el epígrafe 1.2) [72-76], la administración diaria intermitente de *osteostatina* durante 13 días a ratas ovariectomizadas restauró la masa ósea y el contenido de calcio del fémur, aparentemente a expensas de un aparente efecto anabólico sobre el hueso cortical [65]. En este sentido, se ha demostrado que una exposición relativamente breve ( $\leq 24$  h) a la PTHrP (107-139) induce la proliferación de células osteoblásticas de calotas fetales de rata [131].

Un hallazgo de nuestro grupo a resaltar en este sentido, es que ambos dominios de la PTHrP, N- y C-terminal, estimulan la expresión de VEGF en células osteoblásticas humanas [79, 132]. Sin embargo, sólo la PTHrP (107-139), y no la PTHrP (1-36), es capaz de interactuar con el VEGFR2 para inducir la diferenciación y viabilidad osteoblástica [77, 79]. Esto abre nuevas

perspectivas para llegar a entender las posibles acciones anabólicas del fragmento C-terminal de la PTHrP, teniendo en cuenta la estrecha relación entre angiogénesis y osteogénesis durante el proceso de formación ósea [133].

#### **4.6 La regeneración ósea en condiciones de osteopenia**

La comprensión de los mecanismos de regeneración es fundamental para entender el comportamiento del tejido óseo tras el implante de una prótesis dental o durante la recuperación de una fractura. En la osteoporosis, la fractura es la principal complicación y en las intervenciones relacionadas con esta patología (como la reconstrucción de cadera o el implante o sustitución de prótesis articulares) es necesaria una adecuada regeneración ósea en torno a la zona intervenida que evite la pérdida de movilidad, con la consiguiente disminución en la calidad de vida. Sin embargo, a pesar del número creciente de estudios de regeneración ósea en presencia de biomateriales implantados, este tipo de estudios en condiciones de osteopenia/osteoporosis son escasos.

El hueso, a diferencia de la mayoría de los órganos que tras el daño desarrollan una cicatrización fibrosa antes de recuperar su aspecto normal, es capaz de formar directamente un nuevo tejido óseo indistinguible del sano. Este proceso de neoformación ósea es similar al de formación ósea endocondral e intramembranosa embrionaria. Así, en la zona de fractura, se forma un condensado de células mesenquimales que dan lugar primero a condrocitos, generando un callo cartilaginoso que posteriormente se irá calcificando, siendo substituidos los condrocitos por osteoblastos. Este callo de fractura es normalmente de mayor volumen que el hueso circundante, por lo que en la fase final de la regeneración se resorbe el tejido sobrante hasta recuperar la forma del hueso preexistente. Paralelamente, tiene lugar una formación ósea intramembranosa en las zonas astilladas y en las trabéculas afectadas [134].

#### **4.6.1 El modelo de regeneración ósea por ablación de médula**

Aunque existe un gran número de modelos experimentales de regeneración ósea, los más establecidos y estandarizados son los modelos de fractura y los modelos de osteoinducción u osteointegración con biomateriales, por su evidente translación a la práctica clínica [135, 136]. En la mayoría de estos modelos está implicada la regeneración ósea endocondral, que determina la formación de un callo cartilaginoso.

En la presente Tesis, sin embargo, se decidió utilizar el modelo de regeneración ósea por ablación de médula porque el componente de formación ósea endocondral es mínimo, y los fenómenos de regeneración observados son debidos mayoritariamente a la formación ósea intramembranosa, directamente a partir de la diferenciación osteogénica de células mesenquimales [137].

En este modelo de ablación medular, utilizando una fresa de dentista, se extrae la mayoría de las células de la médula y tejido trabecular de un hueso largo a través de una de sus epífisis (Fig. 3 A); tras el cierre de la herida, se inicia el proceso de regeneración de las zonas afectadas (el protocolo experimental se detalla en el apartado correspondiente de Materiales y métodos). Dos días después de la intervención, se forma un coágulo que ocupa las zonas dañadas (Fig 3 B), que es reemplazado por una vascularización organizada, asociada a la proliferación de células estromales a los días 4 y 6 desde la operación (Fig 3 B y C). Estas células se diferencian a osteoblastos, que comienzan a formar hueso a partir del sexto día (Fig 3 D-F). Entre los días 10 y 14, la zona afectada está totalmente ocupada por tejido óseo de nueva formación, iniciándose entonces una etapa de resorción que se mantiene durante una semana más, mientras que las células hematopoyéticas de la médula ósea recuperan su nicho. Tras 21 días de la operación, el hueso presenta un aspecto normal [138]. Este comportamiento secuencial observado en la evolución de este modelo es muy reproducible, y lo hace válido para estudiar el papel de diversos factores osteoregeneradores. Además, este modelo es útil para estudiar, en un periodo relativamente corto, el proceso de diferenciación de las células osteoprogenitoras, reclutadas en sincronía a partir de unos pocos precursores remanentes tras la ablación de médula. Estudios

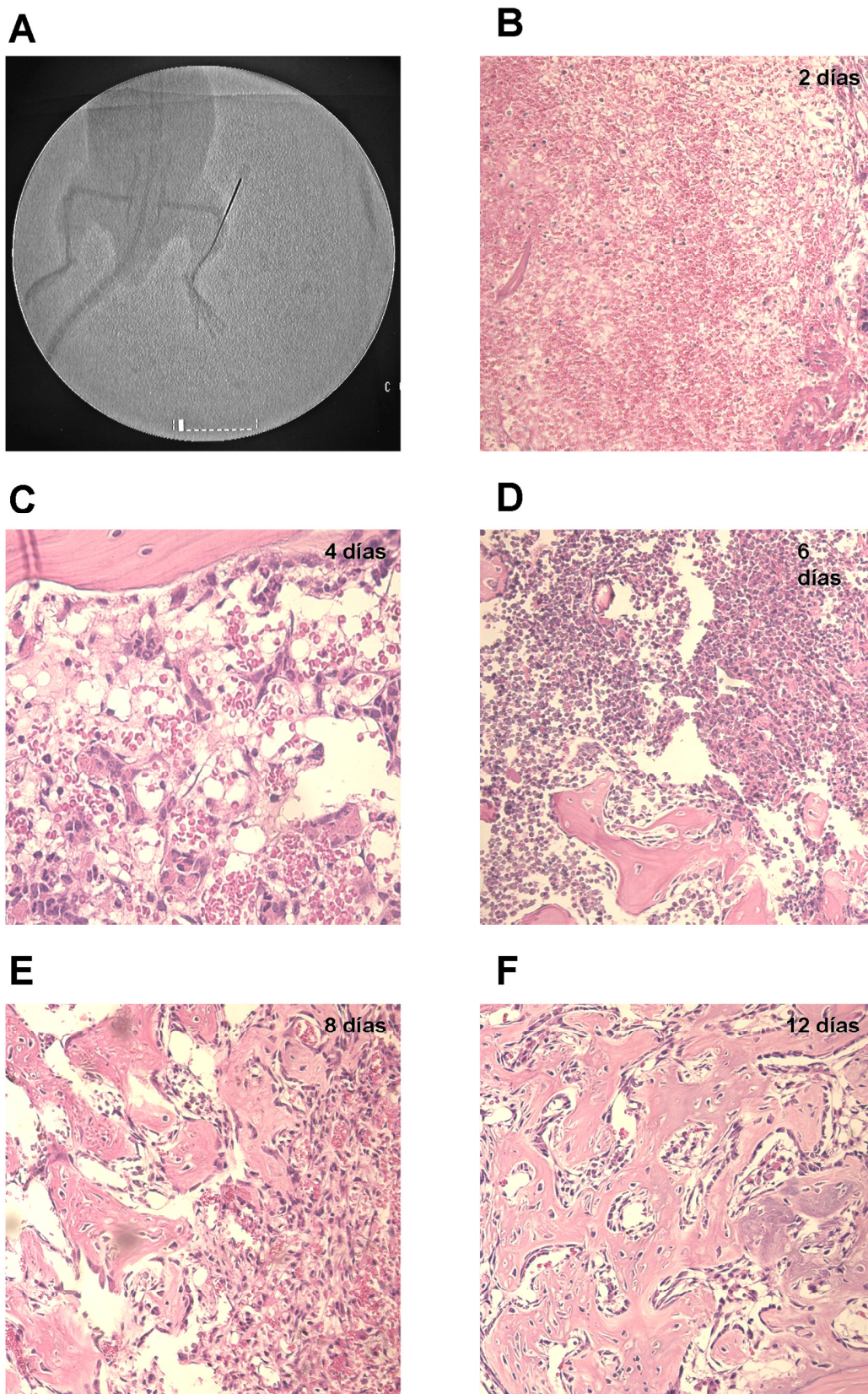


Figura 3. (A) Radiografía de alta resolución mostrando una fresa de dentista insertada a través de la epífisis proximal de la tibia izquierda de un ratón, ocupando la cavidad medular en toda su longitud. (B-F) Micrografías de tinción con hematoxilina-eosina de la tibia en regeneración de ratón tras los días indicados de ablación de médula (200x)

previos en este modelo han determinado la implicación de factores endógenos como los genes Runx2 o Klotho en la regeneración ósea, utilizando ratones delecionados para esos genes [139, 140], así como la expresión de factores como el TNF o las BMPs a lo largo del proceso [138]. Este modelo ha sido utilizado recientemente para evaluar los efectos óseos de un determinado agente exógeno o una situación patológica, como la influencia de los GCs en la rata [141], o de la diabetes mellitus [142] y los efectos osteoformadores de análogos de la vitamina D, en el ratón [143].

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Basándonos en lo expuesto en la introducción, hipotetizamos que una exposición breve a dosis elevadas de GCs compromete el proceso de regeneración ósea. Además, teniendo en cuenta las acciones conocidas de la PTHrP sobre el metabolismo óseo, planteamos que sus fragmentos N- y C-terminal, a través de mecanismos distintos, promueven la regeneración ósea comprometida por los GCs y ejercen acciones osteogénicas sobre el hueso osteoporótico tras la depleción estrogénica. Para confirmar o rechazar estas hipótesis, en la presente Tesis doctoral planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Establecer un modelo de regeneración ósea en ratón que permita estudiar los efectos deletéreos de los GCs sobre el hueso.
- 2.- Caracterizar las acciones osteogénicas de los fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP en este modelo.
- 3.- Comparar la eficacia relativa de ambos fragmentos de la PTHrP para aumentar la masa y/o calidad ósea en un modelo establecido de osteoporosis por depleción estrogénica.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Modelo de regeneración ósea en ratones tratados con GCs

En experimentos preliminares se administró hemisuccinato sódico de 3-metilprednisolona (Urbasón, 3-Mpred) o bien dexametasona a ratones CD1 en inyecciones subcutáneas (s.c.) de 1,5 mg/Kg\*día o bien 10 mg/Kg en días alternos durante 21 días. Posteriormente, utilizamos ratones C57BL/6J machos (16 semanas de edad) suministrados por los Laboratorios Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, España) y estabilizados en el Animalario de la Fundación Jiménez Díaz durante dos semanas. Los animales tuvieron acceso libre a agua y a una dieta estándar (8.8 g/Kg calcio y 5.9 g/Kg fosfato; Panlab, Reus, España) en una habitación mantenida a 22°C con ciclos alternativos de 12 horas de luz y oscuridad. Se llevó un control diario de peso de los ratones.

Para determinar los efectos del tratamiento de los GCs a distintos tiempos de regeneración ósea, un primer grupo de ratones C57BL/6J fue tratado durante 17 días con 3-Mpred (10 mg/kg, inyección s.c.) o vehículo (tampón salino fosfatado, TSF) cada 2 días. Uno, cinco o nueve días después de comenzar el tratamiento, los ratones fueron anestesiados con ketamina/xylazina (2:1, v/v) y se realizó la ablación de médula ósea de la tibia siguiendo la técnica descrita previamente [137, 138] (Fig. 4). Brevemente, se realizaron incisiones oblicuas sobre el ligamento patelar y la tuberosidad tibial y después se perforó dicha zona de la tibia utilizando una aguja de calibre 25G. La médula ósea fue extraída cuidadosamente utilizando fresas de endodoncia de diámetro creciente (0,1-0,35 mm) (Fig. 3A) y, a continuación, la cavidad medular se lavó con salino estéril. La incisión se cerró de inmediato tras la operación. A los 8, 12 o 16 días de la intervención (Fig. 4), los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Tras analizar las muestras obtenidas de este grupo de ratones, se escogió el tiempo de regeneración de 12 días para estudiar la acción anabólica ósea de los fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP. De esta forma, se trató un nuevo grupo de ratones durante 17 días 3-Mpred (10 mg/kg, s.c.) o vehículo (TSB) cada 2 días y PTHrP (1-36) o PTHrP (107-139) (100 µg/Kg, s.c.) o su

vehículo (KCl 50 mM, pH 4,5), también cada 2 días, alternando con el GC (Fig. 4). La operación de ablación de médula se realizó a los 5 días de comenzar estos tratamientos, sacrificándose a los ratones 12 días más tarde (24 h después de la última inyección de los péptidos de la PTHrP).

Las tibias de cada animal fueron lavadas y limpiadas de tejidos blandos y asignadas para evaluaciones histológicas o bien para el cultivo primario de la médula ósea y extracción de ARN total del tejido óseo duro remanente (para lo que fue congelado en N<sub>2</sub> líquido). Los fémures fueron también extraídos, limpiados y congelados a -20°C en una gasa empapada en TSF para estudios de microtomografía computarizada ( $\mu$ -CT). Estos estudios fueron desarrollados con la aprobación y en concordancia con las líneas establecidas por el Comité Ético de Investigación Animal de la Fundación Jiménez Díaz.

## **Modelo de osteoporosis en ratones ovariectomizados (OVX)**

Los ratones C57BL/6J hembras (13 semanas de edad) con una operación de OVX bilateral o simulada (Sham) realizada a las 12 semanas de edad fueron suministrados por los laboratorios Charles Rives (Cerdanyola del Vallés, Barcelona, España). Se estabilizaron en el Animalario de la Fundación Jiménez Díaz durante dos semanas. Los animales tuvieron acceso libre a agua y a dieta estándar en las condiciones mencionadas anteriormente. Igualmente, se llevó un control diario de peso de los ratones.

Cuatro semanas después de la operación, los ratones OVX fueron tratados con PTHrP (1-36) o PTHrP (107-139) (80  $\mu$ g/Kg, s.c.) o con el vehículo citado anteriormente, 5 días a la semana, durante 4 u 8 semanas. Los ratones Sham fueron tratados con el vehículo con una pauta similar. La evolución de la masa ósea se monitorizó mediante densitometrías (Fig. 5). A los ocho y a los dos días antes del sacrificio se les inyectó a los ratones una dosis de 25 mg/Kg de demeclociclina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), fluorocromo de la familia de las tetraciclinas que se une al mineral amorfo de los frentes de mineralización y permite estudiar parámetros dinámicos de remodelado óseo por histomorfometría.

Entre 24 h más tarde de la última inyección de los péptidos de PTHrP, los animales fueron anestesiados, desangrados por punción intracardíaca y sacrificados por dislocación cervical, tras lo que se extrajeron ambos fémures y tibias y las vértebras L1-L4 de cada animal. Se asignaron las tibias para evaluaciones histológicas o bien para el cultivo primario de la médula ósea y extracción de ARN total del tejido duro, como se ha indicado antes. Un fémur fue congelado a -20°C para estudios de microtomografía computarizada ( $\mu$ -CT), mientras que del otro se extrajo la médula ósea para cultivos primarios. La columna se fijó en etanol al 70% para estudios de histomorfometría. El plasma fue extraído de la sangre heparinizada por centrifugación y se congeló a -80°C. Este protocolo contó con la aprobación del Comité Ético de Investigación Animal de la Fundación Jiménez Díaz.

## **Densitometría por absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA)**

En el modelo de OVX, se densitómetró a los ratones tratados con los péptidos de la PTHrP o el vehículo al comienzo del tratamiento (Basales) y tras 4, 6 u 8 semanas del mismo. Para ello se utilizó un equipo PIXIMus I (Lunar, Fitchburg, MA, EEUU), tomándose medidas de DMO ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) en el esqueleto total (excluyendo la cabeza), fémures y columna lumbar (vértebras L1-L4).

## **Histología e inmunohistoquímica**

Las tibias se fijaron y conservaron en p-formaldehído al 4% en TSF a 4°C, o bien se fijaron en solución B5 (Biooptica, Milan, Italia) a temperatura ambiente durante 90 minutos y se conservaron en etanol al 70%. Posteriormente fueron decalcificadas en Mielodec (Biooptica) durante 24 h o bien en Osteosoft (Merck, Whitehouse Station, NJ, EEUU) durante 48-72h, se deshidrataron mediante incubación en etanol a concentraciones crecientes y xilol, y finalmente se incluyeron en parafina, orientándolas de forma conveniente para efectuar cortes en el plano sagital. Los ensayos se llevaron a cabo en secciones de 4  $\mu\text{m}$  cercanas al eje sagital de la tibia, depositadas

sobre portaobjetos pretratados con 3-aminopropiltrietoxisilano (APES, Sigma-Aldrich) o con L-lisina (Polylysine, Thermo, Waltham, MA, EEUU).

Antes de la tinción, las muestras se mantuvieron a 60°C durante 6-24 horas para fijar los tejidos al portaobjetos. Se desparafinaron incubándolas secuencialmente en xilol, etanol 100%, 70% y agua destilada. Tras la tinción, las muestras se deshidrataron y montaron con resina DPX (una mezcla de distireno, plastificante y xilol).

Todas las evaluaciones se realizaron en 2 cortes por tibia, por 2 ó 3 observadores independientes de forma doble ciega y se obtuvieron medias de las observaciones para cada tibia.

- **Histología: Tricrómico de Masson**

Se realizó la tinción de Masson, que permite observar el hueso decalcificado en azul, los hematíes en rojo vivo, los citoplasmas celulares en rosa o rojo y los núcleos en azul oscuro. Se cuantificó el área de hueso de nueva formación (azul) en campos consecutivos a 400 aumentos en el área metafisaria y submetafisaria (aprox. 1 mm<sup>2</sup>) de la tibia proximal en regeneración, utilizando el programa de análisis de imagen Leica QwinPro® V 3.5.0 (Leica, Heerbrugg, Suiza). Los osteoblastos fueron identificados por su apariencia cuboidal y por su localización sobre el hueso de nueva formación y se contaron en esta misma área.

- **Histoquímica: Tinción vascular con lectina**

Para identificar los vasos sanguíneos, se marcaron con una isolectina procedente de la planta *Bandeiraea simplicifolia* conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (L5391, Sigma-Aldrich), que presenta afinidad por el glicocáliz del endotelio vascular de ratón [144]. Para ello, se inactivó primero la actividad peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en TSF (15 min) y a continuación con la isolectina (12,5 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Como cromógeno se utilizó 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y se contrastaron las muestras con hematoxilina. Los vasos sanguíneos en el hueso cortical se contaron en campos consecutivos a 200 aumentos entre la placa de crecimiento y la diáfisis media. Fueron identificados como estructuras

alargadas o redondas positivas para la lectina con células sanguíneas en el lumen.

- **Inmunohistoquímica**

Para las técnicas inmunohistoquímicas, en algunos casos se realizó primero una recuperación antigénica (ver tabla 3). A continuación, se bloquearon las interacciones inespecíficas y se incubó con el anticuerpo primario. Tras inactivar la peroxidasa endógena con  $H_2O_2$  al 3% en TSF (15 min), los cortes se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente.

En los casos en que se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados para amplificar la señal, se realizó una incubación con el complejo estreptavidina-biotina-HRP (ABCComplex, Dako, Glostrup, Dinamarca). Posteriormente se incubaron las muestras con el cromógeno DAB. Se incluyó siempre una muestra sin anticuerpo primario como control negativo. Las muestras fueron contrastadas con hematoxilina.

La tinción de PTHrP y PTH1R se determinó en 4-6 campos aleatorios a 400 aumentos por muestra en el área trabecular de la metáfisis proximal. La intensidad de tinción se evaluó con un método semicuantitativo por puntuación de 0 a 3. Las células con positividad para el receptor de calcitonina (CTR) o la TRAP se determinaron en 10-20 campos consecutivos en el área trabecular de la metáfisis proximal. Se consideraron osteoclastos las células positivas para CTR o TRAP con 3 o más núcleos. Las células mononucleares positivas para CTR o TRAP se identificaron como precursores osteoclásticos [145-147]. Se cuantificaron también los osteocitos positivos para esclerostina y totales, así como las lagunas osteocitarias vacías, en 4-6 campos aleatorios a 400 aumentos en el segmento de hueso cortical comprendido entre la placa de crecimiento y la diáfisis media. La inmunotinción de S-100 se utilizó para cuantificar el número de adipocitos en 4-6 campos aleatorios a 200 aumentos en la diáfisis medio-distal, identificados como estructuras redondas positivas para este anticuerpo sin células sanguíneas lumbinales.

Tabla 3. Condiciones experimentales de las técnicas inmunohistoquímicas.

Antígeno	Exposición antigénica / Incubación	Solución de bloqueo	Anticuerpo primario [dilución] / Incubación	Anticuerpo secundario [dilución] / Incubación
PTHrP	Tripsina bovina 1%, pH 7.4 / 37°C, 30 min	Suero de cabra 10%	Suero de conejo Anti-C13 [1:300] / 24h, 4°C	IgG de cabra anti-conejo-HRP [1:200] / 30 min, T/A
PTH1R			Policlonal de conejo (H-125, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) [1:250] / 24h, 4°C	IgG de cabra anti-conejo biotinilado [1:500] / 30 min, T/A
TRAP		Albúmina de suero bovino 1,25% + suero de cabra 2,5%	Policlonal de conejo (H00000054-D01P, Abnova) [1:300] / 24h, 4°C	Envision-Flex® (Dako) / 30 min, T/A
CTR	Citrato sodico 10mM, pH 6.0 / 95°C, 4 min	Suero de caballo 10%	Policlonal de cabra (sc-8860, Santa Cruz Biotechnology) [1:500] / 24h, 4°C	IgG de burro anti-cabra biotinilado [1:200] / 30 min, T/A
S100	<i>Target Retrieval Solution</i> , pH 6.5 (Dako) / 95°C, 20 min	No	Policlonal de cabra (RZ0311, Dako) [1:500] / 20 min, T/A	Envision-Flex® (Dako) / 30 min, T/A
Esclerostina	No	Suero de conejo 10%	Policlonal de cabra (AF1589, R&D, Minneapolis, MN EEUU) [1:100] / 2h, T/A	IgG de conejo anti-cabra- HRP [1:200] / 30 min, T/A

T/A: Temperatura ambiente.

## Histomorfometría

Para los análisis de histomorfometría ósea, las vértebras L1-L4 se conservaron en etanol 70%. Posteriormente fueron deshidratadas en etanol de concentración creciente y se impregnaron en metil-metacrilato durante 24 h a 4°C. Posteriormente, se orientaron las muestras de forma adecuada para poder realizar los cortes en el plano sagital, y se polimerizó el metil-metacrilato durante 10-15 días en una estufa a 30°C, incrementándose la temperatura 1°C cada 24 h hasta un máximo de 34°C. Una vez polimerizados, los bloques se cortaron con una sierra vertical para aproximar el plano de corte a las muestras y a continuación se realizaron cortes seriados de 7 µm en un microtomo. Para los análisis se utilizaron los cortes más cercanos al eje sagital de la columna. Estos cortes se depositaron en portas pretratados con gelatina de Haupt (una disolución acuosa de gelatina en polvo, glicerina y fenol), se cubrieron con una lámina de polietileno y se prensaron durante 20-24 h a 60°C.

Para llevar a cabo las distintas técnicas cuantitativas, las muestras se deplastificaron incubándolas en metil-acetato y posteriormente en etanol a concentraciones decrecientes. Tras las tinciones, las muestras se deshidrataron y montaron con resina DPX.

Para determinar los parámetros histomorfométricos, se utilizó un micrómetro y una retícula rectangular en el ocular del microscopio [6].

- **Análisis de los frentes de mineralización**

Para determinar los frentes de mineralización marcados *in vivo* con demeclociclina, se deplastificaron las muestras, tras lo que se deshidrataron y montaron como se ha indicado. Las muestras se observaron a 200 aumentos en un microscopio de fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 325-425 nm, para evidenciar los frentes de mineralización marcados con demeclociclina. Así, se determinó en el hueso trabecular tanto el grosor como la longitud de los frentes de mineralización con marcaje simple o doble, además de la distancia entre bandas de este último [6].

- **Tinción de von Kossa**



Esta tinción está basada en una reacción por la cual los iones libres de plata reaccionan con el fosfato y el carbonato cálcico presentes en el hueso mineralizado, substituyendo al calcio. Por reacción a la luz ambiental, los iones de plata se reducen, precipitando el metal (color negro), marcando así de forma específica el hueso mineralizado. Posteriormente, la muestra es incubada con Ponceau de xilidina, que marca los ribetes de osteoide sin mineralizar en color rojo. Se analizaron las muestras a 40 aumentos para determinar el área medular y trabecular de las vértebras y determinar la longitud de las trabéculas. Posteriormente, se determinó la longitud y área de las superficies de osteoide a 200 aumentos utilizando luz polarizada que hace brillar al osteoide, facilitando su identificación.

- **Tricrómico de Goldner**

Esta técnica se utiliza para estudiar la celularidad del hueso sin decalcificar, tiñendo el hueso mineralizado de verde, el osteoide de rojo, los hematies en rosa, los citoplasmas celulares en violeta y los núcleos en negro. Utilizando un microscopio a 200 aumentos, se determinó la longitud de osteoide cubierto de osteoblastos (caracterizados por su forma cuboidea) y la longitud de las lagunas de resorción cubiertas o no por osteoclastos (caracterizados por la presencia de 3 o más núcleos).

- **Determinación de parámetros histomorfométricos:**

*-Parámetros estáticos de formación ósea:*

- Volumen de osteoide (OV/BV): Relaciona el volumen ocupado por osteoide respecto al hueso trabecular total.
- Anchura media de los ribetes trabeculares de osteoide (O.Th).

*-Parámetros estáticos de resorción ósea:*

- Superficie relativa de resorción (ES/BS): Relación entre la superficie de las lagunas de resorción y el área trabecular total.
- Superficie relativa de resorción activa (Oc.S/BS): Relaciona la superficie de las lagunas de resorción asociadas a osteoclastos y el área trabecular total.

- Índice osteoclástico (N.Oc/B.Pm): Relación entre el número de osteoclastos observados y el perímetro trabecular total.

*-Parámetros dinámicos de formación ósea:*

- Grado de formación ósea referido a la superficie trabecular (BFR/BS): Este índice representa el volumen de hueso formado (calculado como el producto entre la superficie marcada con bandas dobles y la distancia entre ambas bandas) en relación al tiempo transcurrido entre las inyecciones y a la superficie trabecular.
- Superficie de mineralización (MS/BS): Este índice da una idea de la fracción de superficie ósea que incorporó demeclocina tras cualquiera de las dos inyecciones y, por lo tanto, se encontraba en etapa de mineralización en ese momento.
- Tiempo medio de retardo de la mineralización (Mlt): Es el periodo de tiempo durante el cual el osteoide permanece sin mineralizar. Se obtiene relacionando la velocidad de síntesis de la matriz ósea (obtenida a partir del espesor medio de la superficie de osteoide en la tinción de von Kossa) y el porcentaje de ribetes de osteoide que presentan formación activa de hueso (obtenido a partir de las muestras marcadas con tetraciclinas).

## **PCR cuantitativa a tiempo real**

Las muestras de tejido duro de las tibias congeladas en nitrógeno líquido se homogeneizaron de forma mecánica. El ARN total del homegeneizado de estas muestras o de los cultivos celulares fue extraído siguiendo un método estándar (Trizol; Invitrogen, Groningen, Holanda). La síntesis de ADNc se realizó utilizando oligonucleótidos aleatorios y la transcriptasa inversa modificada MMLV (Superscript II, Life Technologies, Rockville, MD), durante 2 horas a 37° C. La PCR a tiempo real se realizó con el ADNc en el sistema ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA), con una polimerasa activada por calor TaqDNA (Amplitaq Gold, Applied Biosystems) o bien con *Syber premix ex Taq* (Takara, Otsu, Shiga, Japón). Para los

ensayos con la polimerasa TaqDNA, se utilizaron cebadores específicos de ratón de Runx2, OSX, ALP, OC, OPG, RANKL, la proteína de unión a ácidos grasos 2 (Ap2), PPAR- $\gamma$ 2, TRAP, PTHrP, PTH1R, VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2, SOST y sondas TaqMan MGB específicas (Assay-by-Design<sup>SM</sup>;Applied Biosystems); mientras que para los ensayos con *Syber premix ex Taq* se utilizaron los siguientes cebadores: 5'-ATGCTCTTAGCTGAGGTGCCCCG-3', 5'-ATTCCTAGCTGCGGTATCCAGG-3' (18S); 5'-CAGCAGAGGTGTGTACTATG-3', 5'-GCGTTGTTCTTATTCVGAGC-3' (Cat K); 5'-CAAAAATATATCACACCAAAGGACAAG-3', 5'-GCCCTGCGGCACAGTCT-3' (DKK-1). Para los ensayos con la polimerasa TaqDNA, tras una incubación inicial de 2 minutos a 50° C y 10 minutos a 95° C, las muestras se sometieron a 40 ciclos de 15 segundos a 95° C y 1 minuto a 60° C. Para los ensayos con la polimerasa *Syber premix ex Taq*, tras una incubación inicial de 2 minutos a 95° C, las muestras se sometieron a 40 ciclos de: 15 segundos a 95° C, 30 segundos a 60° C y 40 segundos a 72° C. Los resultados se expresaron como niveles de expresión de cada gen (una vez normalizados frente a los del 18S como gen constitutivo) en cada condición experimental, respecto al control correspondiente [ $2^{-\Delta Ct}$ ], donde Ct representa el ciclo umbral de PCR en el cual el programa detecta por primera vez un incremento apreciable de la fluorescencia sobre la señal basal.  $\Delta Ct = Ct$  (gen de interés) –  $Ct$  (control endógeno, 18S). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

## Cultivo primario de osteoprogenitores

Se extrajo la tibia y el fémur del ratón en condiciones de esterilidad y se perforaron ambas epífisis con una aguja hipodérmica de 19G de calibre. Por uno de los extremos se inyectó 1 ml de medio de aislamiento ( $\alpha$ MEM, 15% de suero fetal bovino -SFB-, 2,5  $\mu$ g/ml de anfotericina B y 1% de penicilina–estreptomicina -PE-) para extraer la médula ósea, que se recogió en una placa de Petri y se disgregó pasándola varias veces a través de la aguja. A continuación, se centrifugó la muestra para recoger las células, que se resuspendieron en medio de cultivo ( $\alpha$ MEM, 15% de SFB, 1% de PE) y se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1 ó  $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Las células se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C, en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Dos días después de la siembra se reemplazó la mitad del medio de cultivo con medio de diferenciación ( $\alpha$ MEM, 10% de FSB, 1% de PE, ácido

ascórbico 50 µg/ml y β-glycerolfosfato 10 mM), reemplazándose la mitad del medio cada 2-3 días.

- **Determinación de las colonias ALP+ y totales**

Tras 14 días de cultivo, los pocillos sembrados a  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> se lavaron con TSF, se fijaron con etanol 70% y se tiñeron las colonias para ALP con un método estándar basado en la precipitación de una sal de diazonio (*Fast Red Violet LB*) en medio alcalino (pH 9,5), a partir de naftol AS-BI fosfato, como sustrato (Sigma-Aldrich). Por último se escanearon estas placas y las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Adobe Photoshop Cs 8 para determinar el porcentaje de superficie teñida.

Para determinar la cantidad total de colonias celulares en la placa de cultivo se tiñeron estos mismos cultivos con cristal violeta. Inicialmente, se escanearon las placas y se analizaron con el programa informático Adobe Photoshop Cs 8 para determinar el porcentaje de superficie teñida. Como método alternativo de cuantificación de esta tinción, se disolvió con Tritón 0,2% tras lavados exhaustivos con TSF, y se cuantificó la cantidad de colorante fijado determinando la absorbancia a 540 nm. Para verificar la validez de este método se determinó la correlación entre la superficie teñida y la absorbancia de estos mismos cultivos a 540 nm, que se halló significativa (Fig. 6).

- **Determinación de las colonias mineralizadas**

Tras 21 días de cultivo, se lavaron las colonias con TSF, se fijaron con etanol 70% y se tiñeron con rojo de alizarina (40 mM, pH 4,2). Posteriormente, la superficie total mineralizada se determinó tras escaneado con el programa Adobe Photoshop Cs 8 y se cuantificó el número de nódulos de mineralización en los casos en que se podían diferenciar. Como método alternativo, se cuantificó la cantidad de colorante asociado a las colonias disolviendo la tinción con cloruro de cetilpiridinio al 10% en fosfato sódico 10 mM, pH 7.0, midiendo su absorbancia a 620 nm.

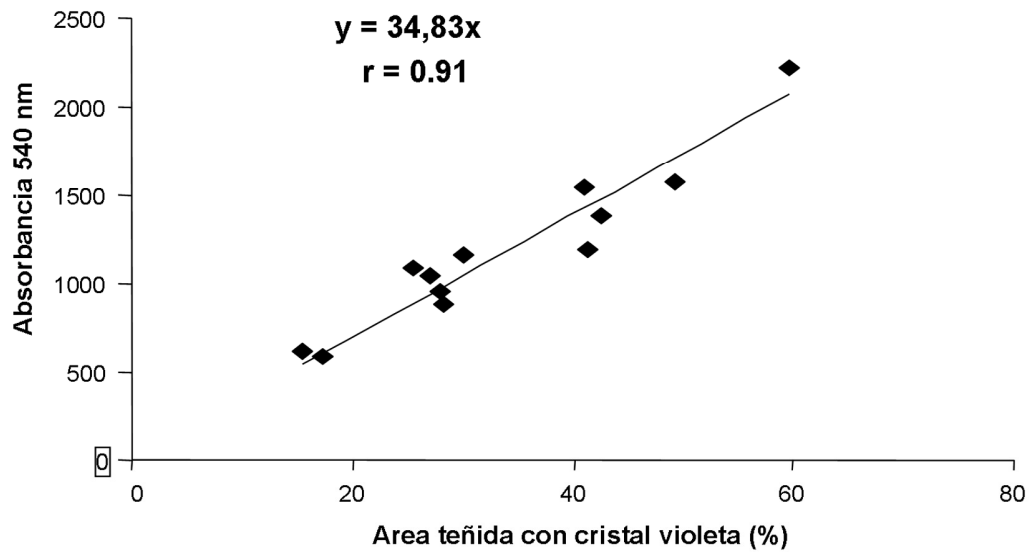
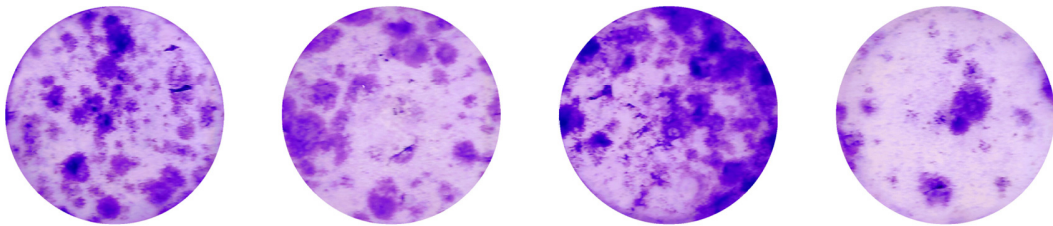
**A****B**

Figura 6. (A) Gráfico de tendencia, fórmula e índice de correlación entre la dilución del cristal violeta fijado a la placa de cultivo y el área teñida. (B) Algunos ejemplos de placas de 10 cm<sup>2</sup> teñidas con cristal violeta. Se analizaron 12 pocillos de 10 cm<sup>2</sup>.

## Microtomografía computerizada

Los fémures fueron descongelados a temperatura ambiente, sumergidos en salino y escaneados con un sistema de microtomografía de alta resolución (SkyScan 1172, Skyscan N.V., Aartselaar, Bélgica). Todas las muestras fueron escaneadas con un tubo de rayos X con un voltaje de 100 kV y una corriente de 100  $\mu$ A sin filtro. El ángulo de rotación del escaneo fue de 185° y el ángulo de incremento de 0,40°. Las imágenes se reconstruyeron en función del algoritmo de Feldkamp. Para determinar la microarquitectura de las regiones de hueso trabecular y cortical, las muestras se evaluaron de acuerdo al volumen de interés en la metáfisis del fémur distal utilizando un programa estándar

(SkyScan™ CT-analyzer software, versión 1.7.0.5). El volumen correspondiente al área trabecular se seleccionó entre los 0,6 y los 2,1 mm desde la placa de crecimiento distal (excluyendo la región de esponjosa primaria) y entre los 2,5 y 3,1 mm para el volumen cortical. El sistema de análisis proporcionó un cálculo asistido de los siguientes parámetros:

*-Parámetros microestructurales corticales:*

- Espesor cortical (Ct.Th): Determina el grosor medio del tejido mineralizado de una serie de cortes transversales de la región cortical de interés (mm).
- Área de hueso cortical (B.Ar): Determina el área media de tejido mineralizado presente en una serie de cortes transversales de la región cortical de interés (mm<sup>2</sup>).
- Porosidad (Po): Cuantifica el área de espacios no mineralizados cerrados presentes en varios cortes transversales de la región cortical respecto al área de tejido mineralizado (%).
- Momento medio de inercia (MMI): Proporciona un cálculo básico de la resistencia mecánica esperada de una región cortical. Se obtiene calculando la resistencia ofrecida a la rotación en torno al eje longitudinal del hueso en varios cortes virtuales en el plano transversal de esta región (mm<sup>4</sup>).

*-Parámetros microestructurales trabeculares:*

- Porcentaje de volumen óseo (BV/TV): Relaciona el volumen de tejido óseo calcificado respecto del volumen total del área analizada (%).
- Densidad de superficie ósea (BS/TV): Relaciona la superficie del tejido óseo mineralizado respecto del volumen total del área analizada (mm<sup>-1</sup>).
- Espesor trabecular (Tb.Th): Grosor medio de las trabéculas óseas calculado a partir de una reconstrucción 3D (mm).

- Separación Trabecular (Tb.Sp): Separación media de las trabéculas óseas calculado a partir de una reconstrucción 3D (mm).
- Número de trabéculas (Tb.N): Número medio de trabéculas por milímetro lineal en el área trabecular ( $\text{mm}^{-1}$ )
- Factor de patrón trabecular (Tb.Pf): Índice de conectividad del hueso trabecular. Está basado en el principio de que una mayor concavidad trabecular indica una mayor conectividad, al aumentar la probabilidad de existir nodos de conexión entre las trabéculas [148]. De esta forma, un Tb. Pf menor indica una mayor conectividad trabecular ( $\text{mm}^{-1}$ ).
- Grado de anisotropía (DA): Es un factor que determina el alineamiento preferencial de las trabéculas a lo largo de un eje cualquiera. Así, la reconstrucción tridimensional del área trabecular se compara con diversos grupos de líneas direccionales paralelas, de forma que aquél que presente menos intersecciones con las trabéculas óseas indica una dirección preferente de alineamiento trabecular. Posteriormente se someten estos datos obtenidos a una serie de algoritmos que determinan el grado, que varía entre 1 (estructura completamente isotrópica o no alineada) e infinito (estructura completamente anisotrópica o alineada). Cabe destacar que un menor DA indica una mayor resistencia trabecular a las fuerzas direccionales a las que suelen estar expuestas [149].
- Índice de estructura del modelo (SMI): Este es un factor numérico que representa la conformación tridimensional preferente de las trabéculas. Sus valores varían entre 0 (forma de plato), 3 (forma de cilindro) y 6 (forma de esfera). En los procesos osteoporóticos, normalmente las trabéculas muestran una transición en su forma desde plato hacia cilindro, por lo que un mayor valor de este índice muestra una peor estructura ósea.

## **Análisis bioquímicos en plasma**

- **Marcadores de remodelado óseo**

*-Concentración de la OC en plasma:* La OC es la proteína no colágena con más presencia en el hueso. En la etapa de formación ósea, los osteoblastos secretan OC, liberando una pequeña cantidad al torrente sanguíneo. Así pues, la concentración de OC es un marcador circulante del grado de formación ósea. Se cuantificó mediante un inmunoensayo enzimático (Biomedical Technologies, Stoughton, MA, EEUU). Este ensayo proporciona la concentración de OC (ng/ml) en plasma con un límite mínimo de detección de 1 ng/ml.

*-Concentración de enlaces cruzados de piridinolinas (PYD) en plasma:* Los PYD son productos de degradación del colágeno tipo I o II, componentes proteicos principales del hueso y cartílago, respectivamente. Su concentración plasmática se cuantificó mediante un inmunoensayo enzimático (Metra PYD EIA, Quidel, San Diego, CA, EEUU). Este ensayo proporciona la concentración de PYD (nM) en plasma con un límite de detección de 0,4 nM. Para las concentraciones analizadas (0,8-3 nM), el coeficiente de variación intra-ensayo es de un 8,3% y el coeficiente de variación inter-ensayo es de un 8,7%.

- **Calcio, fósforo y creatinina**

Las determinaciones de creatinina sérica se analizaron por el método Jaffé punto final, un método colorimétrico con picrato alcalino, utilizando para ello un autoanalizador Roche modular DDPP. Es un test cinético colorimétrico, en el cual se añade en un primer paso, la muestra junto con hidróxido sódico, para crear un ambiente alcalino, y después, se añade ácido pícrico. En estas condiciones, la creatinina forma un complejo amarillo-naranja con el picrato. La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de creatinina y puede medirse fotométricamente. Puede existir interferencia con la bilirrubina, que se reduce en los tests que emplean la determinación del blanco. Las muestras de suero y plasma contienen proteínas que reaccionan de forma no específica con el método Jaffé. Ello se soluciona, corrigiendo en 0.3 mg/dL los resultados para obtener los valores finales. El límite de detección de este método es de 0,1 mg/dl y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo son 0,7% y 2,3%, respectivamente.



Las determinaciones de calcio y fósforo en suero se realizaron por el método de la cresolftlaeína-complexona punto final, utilizando un autoanalizador Roche modular DDPP. Se trata de un test colorimétrico con determinación del punto final y blanco de muestra. En un primer paso, se añade la muestra junto con un tampón de etanolamina, para crear un ambiente alcalino, y después, se añade el cromógeno (Complexota o-cresolftaleína). Se corta la reacción con ácido clorhídrico. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de calcio o fósforo que se mide fotométricamente. El límite de detección de este método es de 0,2 mg/dl y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo son 0,9% y 1,5%, respectivamente.

## **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Se hicieron comparaciones no paramétricas entre muestras no pareadas por la prueba de Mann-Whitney y ANOVA no paramétrico entre varias muestras (Kruskal-Wallis) seguido de una prueba post-hoc (Dunn). Todos los valores con  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.

# RESULTADOS

## RESULTADOS

### Modelo de regeneración ósea en ratones tratados con GCs

En una primera fase del estudio, se determinó la dosis y duración del tratamiento con 3-Mpred o dexametasona necesarias para observar efectos catabólicos en el hueso de ratón. Se utilizaron para ello ratones machos CD1 y se realizaron tinciones histológicas de la tibia y análisis de expresión génica de marcadores óseos en la tibia y el fémur (*datos no mostrados*). Según este estudio preeliminar se decidió utilizar la 3-Mpred, ya que indujo efectos más leves y reproducibles que la dexametasona y además es frecuentemente utilizada en la práctica clínica (con el nombre comercial de *Urbasón*). Además, se determinó una pauta óptima de tratamiento por inyecciones subcutáneas en días alternos de 10 mg/kg de 3-Mpred durante 17 días.

Posteriormente, procedimos a determinar el periodo de regeneración adecuado para observar un efecto deletéreo de la 3-Mpred tras la ablación medular en la tibia de ratón. Para ello, utilizamos ratones macho C57/BL6J, al ser una cepa consanguínea que disminuiría la variabilidad de respuesta al tratamiento observada en ratones CD1, no consanguíneos. La ablación se realizó a los 8, 12 ó 16 días antes del sacrificio, con un tratamiento similar de 3-Mpred o su vehículo en todos los grupos, según se indica en la Fig. 7.

La expresión de marcadores osteogénicos en la tibia en regeneración de los ratones sacrificados 8 días después de la ablación no mostró diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con 3-Mpred. A los 12 días de regeneración, sin embargo, observamos una disminución de ~50% en la expresión de la mayoría de los marcadores estudiados; mientras que a los 16 días de regeneración se observó una tendencia a la normalización de algunos de ellos (Fig. 7A-).

Los cultivos primarios de osteoprogenitores de la médula ósea de las tibias tras 8 días en regeneración mostraron, a los 14 días de cultivo, un menor número de colonias totales formadas en los ratones tratados con el GC respecto a los controles. A los 12 días de regeneración, las colonias obtenidas

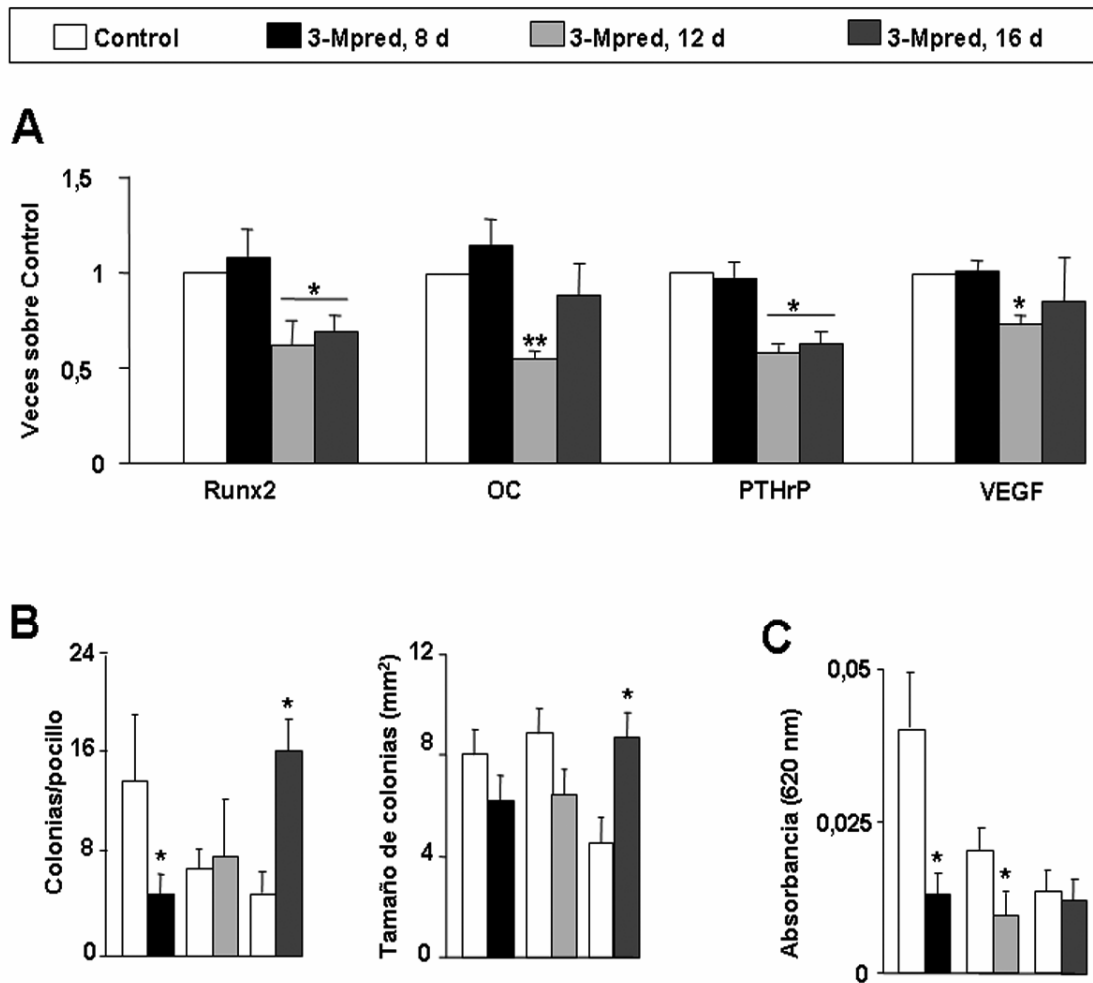


Figura 7. (A) Cambios en la expresión de marcadores óseos (por PCR a tiempo real) en la tibia en regeneración de ratones tratados con 3-Metilprednisolona (3-Mpred) respecto a su control respectivo (salino) (=1), tras 8, 12 y 16 días desde la ablación medular. (B) Número y tamaño de colonias celulares de la médula ósea (por tinción con cristal violeta) a distintos tiempos de regeneración medular. (C) Capacidad de mineralización (por tinción con rojo de alizarina) del cultivo primario de médula ósea de la tibia a distintos tiempos de regeneración tras la ablación medular. Los valores son la medias  $\pm$  EEM (n=4-6). \*p<0,05; \*\*<0,01 vs Vehículo.

de los ratones tratados con el GC mostraron una tendencia a tener un menor tamaño comparadas con su respectivo grupo control ( $p=0,1$ ;  $n=4$ ), mientras que su número fue similar en ambos grupos de ratones. Por el contrario, tras 16 días de regeneración, tanto el número como el tamaño de las colonias obtenidas eran significativamente mayores en los ratones tratados con 3-Mpred que en los controles (Fig. 7B). Con respecto a la mineralización, se observó una disminución progresiva de la superficie mineralizada en los cultivos del grupo control a medida que avanzaba el periodo de regeneración; mientras que en los ratones tratados con el GC, la mineralización se mantuvo estable

durante el periodo de estudio, e inferior a los controles a los 8 y 12 días de regeneración (Fig. 7C).

Basándonos en estos resultados, establecimos los 12 días como el tiempo de regeneración idóneo para valorar las acciones osteogénicas de los péptidos de la PTHrP en este modelo.

En este estudio preliminar, observamos una pérdida de peso en los grupos tratados con 3-Mpred (datos no mostrados), por lo que decidimos hacer un seguimiento del peso de los ratones una vez seleccionado el protocolo para evaluar la acción de los péptidos de la PTHrP (Fig. 8). Así, corroboramos la pérdida de peso observada previamente en los ratones tratados con el GC, a partir del día de la operación de ablación de médula (día 5).

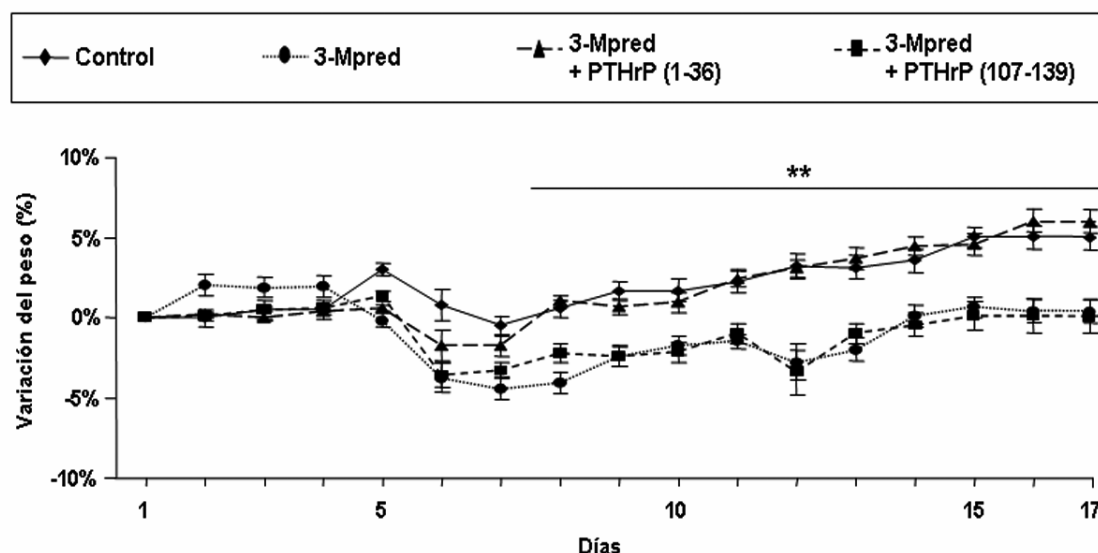


Figura 8. Evolución temporal del peso de los ratones con los distintos tratamientos. Los valores son medias  $\pm$  EEM (n=8-10). \*\*p<1,01 vs Control.

Mediante la tinción de Masson, en la tibia en regeneración de los ratones controles se observó abundante formación de tejido óseo y osteoblastos en la zona trabecular submetafisaria a los 12 días de la ablación medular, como se ha descrito previamente en otras estirpes de ratón [138]. Por el contrario, en los ratones tratados con 3-Mpred se observó una disminución de estos parámetros y, además, un acusado aumento de adipocitos en la zona medio-distal diafisaria (Fig. 9A-C). Estas alteraciones inducidas por la 3-Mpred en el área en



regeneración se asociaron a una disminución en el número de osteocitos positivos para esclerostina en el hueso cortical, en el que se observó además abundantes lagunas vacías (Fig. 10 A), así como un aumento de osteoclastos multinucleados, en detrimento de un menor número de precursores mononucleares (Fig. 10 B).

Evaluamos en estos ratones la expresión génica de diversos marcadores de diferenciación y función osteoblástica en la tibia en regeneración. Como observamos en nuestro estudio preliminar, los niveles de ARNm de Runx2, un factor de transcripción clave en la diferenciación temprana de las células estromales hacia la osteoblastogénesis [150], así como los niveles de OC, un marcador osteoblástico más tardío, se mostraron disminuidos durante la regeneración ósea en los ratones tratados con el GC. La expresión de otros genes como OSX, ALP, OPG y RANKL, controlados por Runx2 [150], también disminuyó significativamente en la tibia en estos ratones (Fig. 11A). La 3-Mpred, sin embargo, provocó un aumento significativo de la expresión del marcador adipocitario Ap2 (Fig. 11 A) [151], en consonancia con el aumento de adipocitos observado en la diáfisis medio-distal. Estos cambios se asociaron a una disminución de la expresión de PTHrP, pero no de PTH1R tanto a nivel de ARNm (por PCR a tiempo real) como proteico (por inmunotinción) (Fig. 11 A y B)

Previamente se ha descrito que las alteraciones en la angiogénesis contribuyen al efecto deletéreo de los GCs en el hueso [108], por lo que se analizó la vascularización en el modelo de regeneración ósea utilizado en nuestro estudio. Así, observamos un menor número de vasos sanguíneos en los ratones tratados con 3-Mpred (Fig. 9 D), asociado a una menor expresión de VEGF y sus receptores (Fig. 11A).

Los efectos negativos la 3-Mpred durante la regeneración ósea fueron analizados también en cultivos ex vivo de células estromales de la médula ósea procedentes de las tibias tras la ablación. Observamos una disminución del área positiva para ALP, sin cambios significativos en la formación de colonias totales teñidas con cristal violeta, en el grupo de ratones tratados con el GC respecto a los controles (Fig. 12A). En estos cultivos se apreció además una

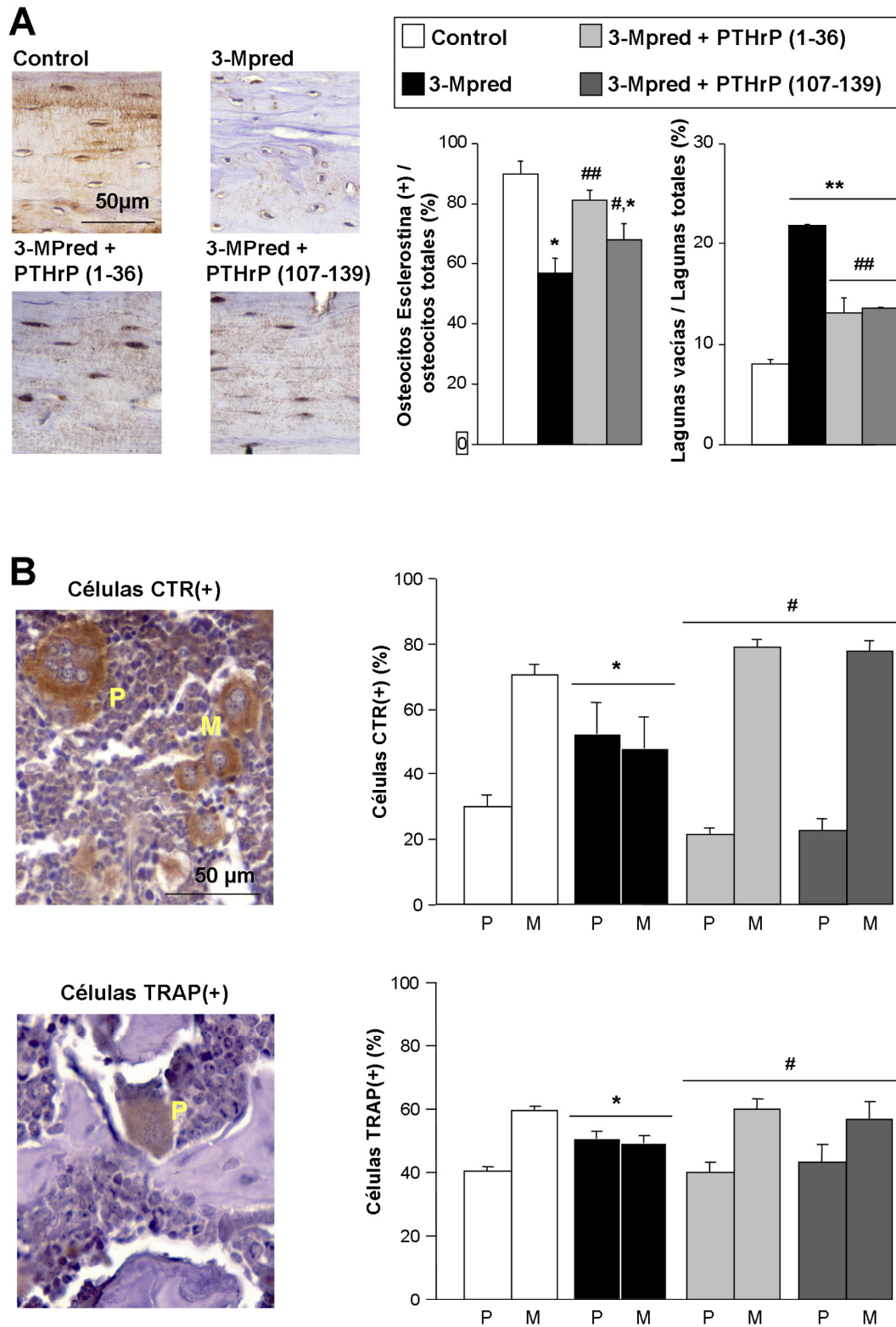


Figura 10. Inmunotinción de esclerostina, CTR y TRAP en la tibia en regeneración de los distintos grupos de ratones. (A) Imágenes representativas y cuantificación de osteocitos positivos para esclerostina y totales. Cuantificación de lagunas vacías ó ocupadas por osteocitos en la tibia cortical. (B) Imágenes representativas y cuantificación de osteoclastos polinucleados (P) y precursores mononucleares de osteoclastos (M) con tinción positiva para CTR ó TRAP. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM de 5-8 ratones por grupo experimental. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs el control correspondiente; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs 3-Mpred.

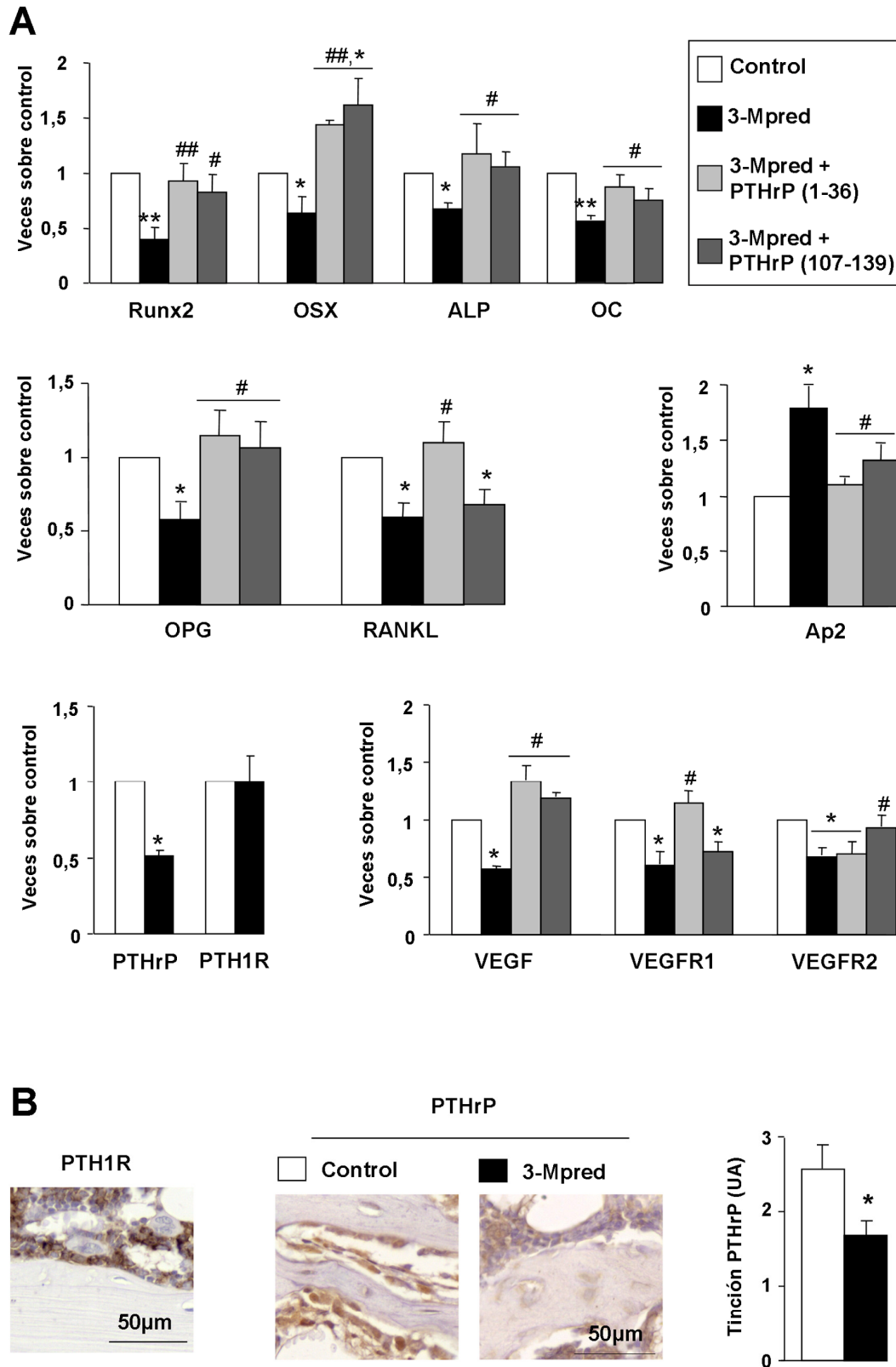
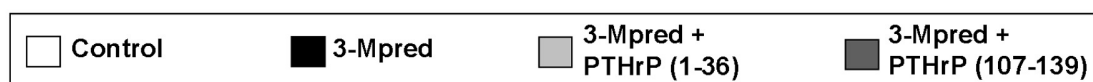
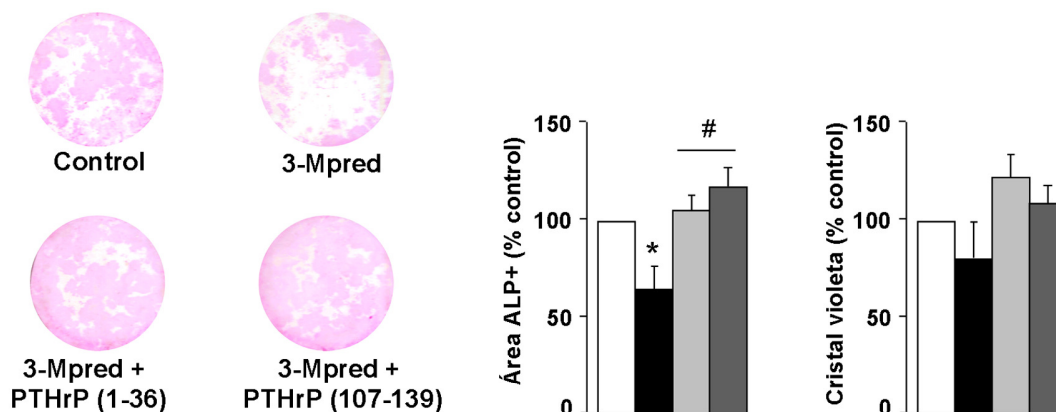


Figura 11. Expresión de diversos marcadores óseos en la tibia de ratón post-ablación. (A) Expresión génica de Runx2, OSX, ALP, OC, OPG, RANKL, Ap2, así como de PTHrP y PTH1R y sus receptores correspondientes: VEGFR1 y 2. (B) Inmunohistoquímica para PTHrP y PTH1R. Imágenes representativas en la metáfisis de la tibia en regeneración. Los valores se expresaron como media  $\pm$  EEM de 5-10 ratones por grupo experimental. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs control; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs 3-Mpred





**A**



**B**

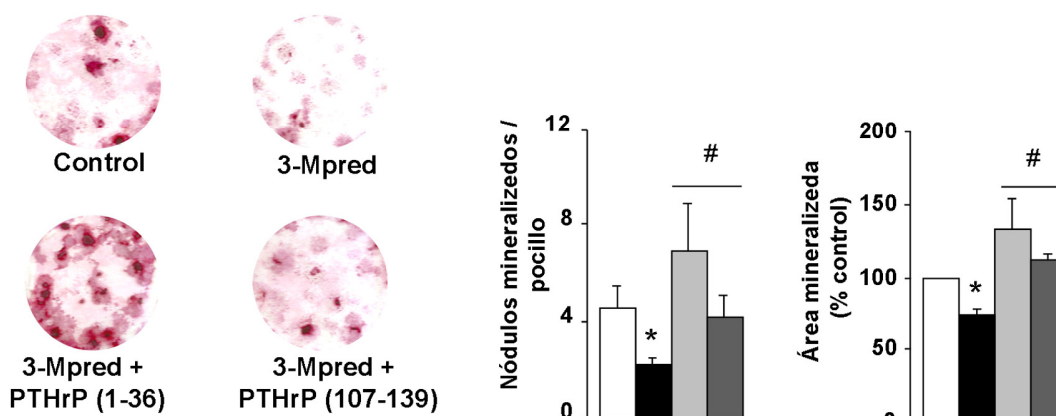


Figura 12. (A) Cuantificación de colonias positivas para ALP y de las colonias totales (por tinción de cristal violeta) tras 14 días de cultivo primario de las células estromales de las tibias en regeneración de los distintos grupos de ratones (B) Nódulos mineralizados por pocillo de cultivo y área mineralizada respecto al control por tinción de rojo de alizarina tras 21 días de cultivo. Se muestran imágenes representativas de colonias positivas para ALP (A) y de nódulos teñidos con rojo de alizarina (B). Los valores son medias  $\pm$  EEM. Cultivos independientes de 8-10 ratones por grupo experimental. \* $p < 0,05$  vs control; # $p < 0,05$  vs 3-Mpred.

disminución significativa de la mineralización, tanto en el área como en el número de nódulos mineralizados, inducida por la 3-Mpred (Fig. 12 B).

El tratamiento con PTHrP (1-36) previno la pérdida de peso y las alteraciones histológicas inducidas por la 3-Mpred en la tibia en regeneración (Figs. 8 y 9) así como la expresión de diversos marcadores osteoblásticos (excepto en el caso del VEGFR2) (Fig. 11A). Sin embargo, la administración de

PTHrP (107-139) a los ratones tratados con el GC no afectó al peso corporal, aunque estimuló la regeneración ósea (Figs. 8 y 9). Este péptido normalizó además la expresión génica de la mayoría de los factores estudiados en la tibia en regeneración, excepto RANKL y VEGFR1 (Fig. 11A). Estas acciones osteogénicas de ambos péptidos de la PTHrP se confirmaron en los cultivos *ex vivo* de osteoprogenitores de la tibia en regeneración. Así, tanto la PTHrP (1-36) como la PTHrP (107-139) revirtieron la disminución del área positiva para ALP y la mermada capacidad de mineralización de los cultivos procedentes de los ratones tratados con el GC (Fig. 12 A y B).

Para determinar los posibles efectos anabólicos de ambos péptidos de la PTHrP en el hueso intacto de estos animales, se analizó la estructura ósea en el fémur intacto mediante  $\mu$ CT (tabla 4, Fig. 13).

Tabla 4. Parámetros estructurales en el fémur intacto de ratón (trabecular y cortical) y sus alteraciones con los distintos tratamientos.

		Control	3- Mpred	3-Mpred+ PTHrP(1-36)	3-Mpred+ PTHrP(107-139)
Parámetros corticales	Ct. Th (mm)	0,124±0,003	0,10±0,01*	0,123±0,002 <sup>#</sup>	0,121±0,003 <sup>#</sup>
	B. Ar (mm <sup>2</sup> )	0,76±0,03	0,58±0,07*	0,71±0,02 <sup>#</sup>	0,70±0,05
	Po (%)	0,24±0,05	0,56±0,13*	0,20±0,04 <sup>##</sup>	0,23±0,07 <sup>#</sup>
Parámetros trabeculares	BV/TV (%)	9,89±0,87	8,79±0,20	10,99±0,81 <sup>##</sup>	9,43±0,59
	Tb. Th (mm)	0,045±0,002	0,046±0,002	0,050±0,001 <sup>*,#</sup>	0,046±0,001
	Tb. N (mm <sup>-1</sup> )	2,21±0,20	1,893±0,057*	2,265±0,161 <sup>#</sup>	2,07±0,17
	Tb. Pf (mm <sup>-1</sup> )	24,78±2,14	28,55±2,06*	24,68±1,42 <sup>#</sup>	25,90±1,89
	DA	2,17±0,10	1,91±0,08*	2,13±0,12	2,05±0,06 <sup>#</sup>

Ct.Th, espesor cortical; B.Ar, área de hueso cortical; Po, porosidad; BV/TV, porcentaje de volumen óseo; Tb.Th, espesor trabecular; Tb.N, número de trabéculas; Tb.Pf, factor de patrón trabecular; DA, grado de anisotropía SMI. Los valores son medias  $\pm$  EEM de 4 a 8 animales por grupo. \*p<0,05 vs control; #p<0,05; ## p<0,01 vs Mpred.

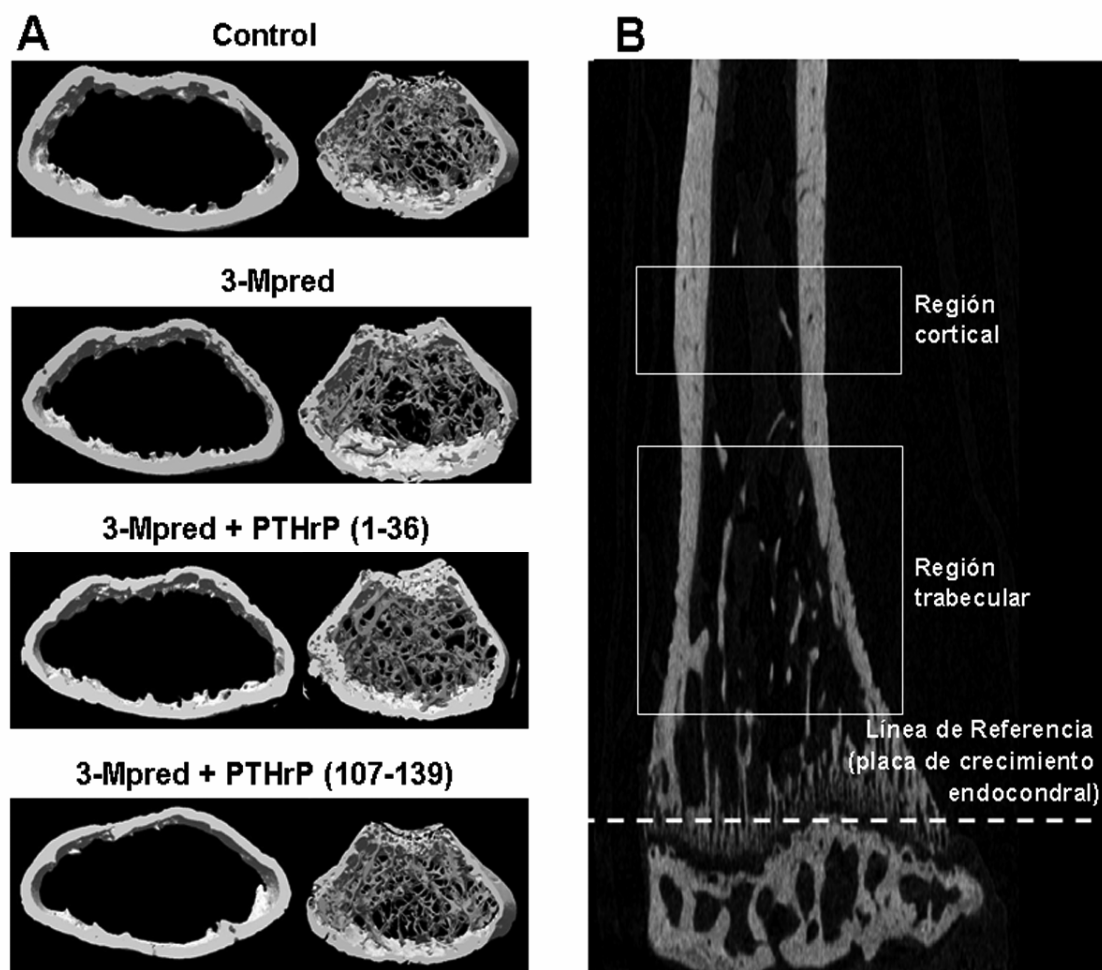


Figura 13. (A) Imágenes representativas de  $\mu$ CT images de las áreas corticales y trabeculares de los distintos grupos experimentales. (B) Imagen longitudinal del femur distal intacto por  $\mu$ CT mostrando los sectores cortical y trabecular utilizados para el análisis.

En los ratones tratados con 3-Mpred, se observó una disminución significativa en el área y espesor corticales (B. Ar. y Ct. Th.) de la diáfisis femoral, acompañados de un aumento en su porosidad. En el hueso trabecular, el área relativa de tejido óseo (BV/TV) mostró una tendencia no significativa ( $p=0.08$ ;  $n=8$ ) a disminuir por el tratamiento con la 3-Mpred, relacionada con una disminución del número de trabéculas (Tb.N), en comparación con el grupo control.

Además, la 3-Mpred provocó una disminución en la calidad estructural del hueso trabecular, como demuestran los valores de DA y Tb.Pf (Tabla 4). Estos cambios estructurales fueron revertidos con el tratamiento con PTHrP (1-36), en muchos casos sobrepasando al grupo control (Tb.Th., Tabla 4). El

fragmento PTHrP (107-139), sin embargo, restauró las alteraciones corticales en el fémur de estos ratones, pero sólo se mostró eficaz para recuperar la correcta alineación a nivel trabecular (DA, Tabla 4).

Las alteraciones estructurales inducidas por la 3-Mpred en el fémur de ratón y las acciones osteogénicas de ambos fragmentos de la PTHrP en estos animales se observan en reconstrucciones tridimensionales de cada caso (Fig. 13).

## Modelo de osteoporosis en ratones con OVX

Desde las cuatro semanas de la OVX (periodo basal), los ratones mostraron una menor masa ósea respecto de los Sham en el cuerpo total y a nivel femoral (Fig. 14); aunque este efecto no se observó hasta las 6 semanas post-OVX en las vértebras L1-L4. El fragmento 1-36 de la PTHrP incrementó la masa ósea a partir de las 2 semanas de tratamiento, un efecto que fue significativo en la región femoral, mientras que en las vértebras lumbares y el cuerpo total, esta significación no se alcanzó hasta las 4 semanas de tratamiento. La PTHrP (107-139) indujo un efecto osteogénico similar al del péptido N-terminal a nivel de fémur y cuerpo total, pero no en el hueso predominantemente trabecular de las vértebras y solo a las 2 semanas de tratamiento.

El análisis de la estructura femoral por  $\mu$ CT a las 12 semanas desde la operación (tras 8 semanas de tratamiento con los péptidos de la PTHrP) (Tabla 5, Fig. 15), reveló una pérdida de hueso cortical (B. Ar, Ct. Th) a nivel diafisario, asociado a un descenso en su resistencia mecánica estimada (MMI); así como un menor número de trabéculas (Tb. N), más separadas entre sí (Tb. Sp) y menos conectadas (Tb. Pf.) en los ratones con OVX respecto a los SHAM. Sin embargo, la OVX no afectó al espesor de las trabéculas (Tb. Th), aunque sí a su forma (SMI). Estos cambios resultaron en un menor volumen y superficie óseos relativos a nivel trabecular (BV/TV, BS/TV). El tratamiento con PTHrP (1-36) revirtió parcialmente estos efectos, mejorando el área y el MMI del hueso cortical, aunque no hasta niveles del grupo Sham. A nivel trabecular, este péptido mejoró significativamente los parámetros de BS/TV, Tb. N, Tb. Pf y SMI, y mostró una tendencia no significativa a recuperar el BV/TV ( $p=0,7$ ;  $n=5$ ), mientras que no indujo cambios en el grosor ni en la separación trabecular. Por otro lado, pese a no verse reflejado en los datos de DMO, el tratamiento durante 8 semanas con PTHrP (107-139) provocó cambios significativos en el MMI a nivel cortical y en el número, grosor y conectividad de las trabéculas, recuperando parcialmente los parámetros de BV/TV y BS/TV (Tabla 5, Fig. 15)

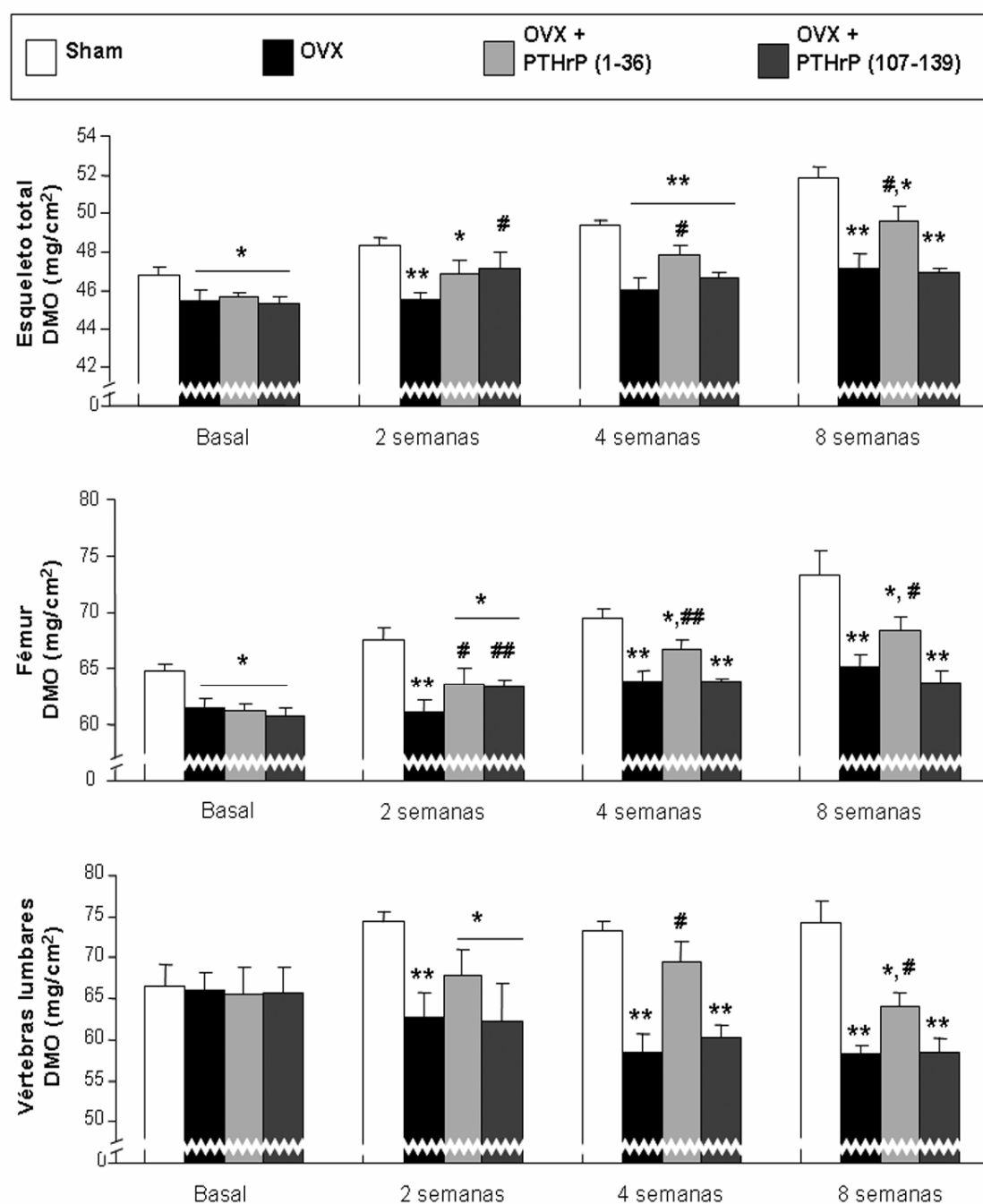


Figura 14. Valores DMO de los distintos grupos de ratones tras 4 (basal), 6, 8 y 12 semanas desde la operación de OVX o Sham (se muestran los tiempos de tratamiento con PTHrP o vehículo), determinados por DEXA del cuerpo total (exceptuando la cabeza), fémures izquierdo y derecho y vértebras L1-L4. Los valores son medias  $\pm$  EEM de 10 ratones/grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs Sham, # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs OVX

Tabla 5. Parámetros estructurales del fémur de ratón (trabecular y cortical) y los cambios inducidos tras 12 semanas de OVX o Sham y 8 semanas de tratamiento con PTHrP (1-36) o PTHrP (107-139).

		Sham	OVX	OVX+ PTHrP(1-36)	OVX+ PTHrP(107-139)
Parámetros corticales	<b>Ct. Th (mm)</b>	0,180 ±0,006	0,162±0,003*	0,172±0,005	0,170±0,003
	<b>B. Ar (mm<sup>2</sup>)</b>	0,866±0,020	0,738±0,027**	0,807±0,021 <sup>#,*</sup>	0,786±0,007**
	<b>MMI (mm<sup>4</sup>)</b>	0,514±0,034	0,409±0,03*	0,464±0,016 <sup>#</sup>	0,447±0,004 <sup>#,**</sup>
Parámetros trabeculares	<b>BV/TV (%)</b>	5,09±0,16	2,89±0,24**	4,11±0,41	4,43±0,17 <sup>#,**</sup>
	<b>BS/TV (mm<sup>-1</sup>)</b>	4,56±0,06	2,79±0,20**	3,52±0,21 <sup>#,**</sup>	3,48±0,03 <sup>#,**</sup>
	<b>Tb. Sp (mm<sup>-1</sup>)</b>	0,368±0,007	0,457±0,030*	0,457±0,026*	0,422±0,006 <sup>#,**</sup>
	<b>Tb. N (mm<sup>-1</sup>)</b>	1,13±0,02	0,65±0,04**	0,89±0,06 <sup>#,**</sup>	0,83±0,01 <sup>#,**</sup>
	<b>Tb. Th (mm)</b>	0,045±0,001	0,044±0,001	0,046±0,002	0,053±0,002 <sup>#,*</sup>
	<b>Tb. Pf (mm<sup>-1</sup>)</b>	34,53±0,97	42,81±0,38*	35,31±2,52 <sup>#</sup>	35,50±1,29 <sup>#</sup>
	<b>SMI</b>	2,36±0,07	2,65±0,03**	2,41±0,05 <sup>#</sup>	2,67±0,06**

Ct.Th, espesor cortical; B.Ar, área de hueso cortical; MMI, momento medio de inercia; BV/TV, porcentaje de volumen óseo; BS/TV, densidad de superficie ósea; Tb.Th, espesor trabecular; Tb.N, número de trabéculas; Tb.Pf, factor de patrón trabecular; SMI, índice de estructura del modelo. Los valores son medias ± EEM de 5 animales por grupo. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs Sham; #p<0,05; ## p<0,01 vs OVX.

Los análisis histomorfométricos por fluorescencia de las muestras marcadas con demeclociclina y de las tinciones de von Kossa y de Goldner en las vertebrae L1-L4 (Fig.16, Tabla 6), mostraron a las 12 semanas de la OVX una disminución del volumen de osteoide, de la tasa de formación ósea y de la superficie relativa de formación activa instantánea, acompañada de una mayor superficie relativa de resorción (ES/BS), activa e índice osteoclástico (N.Oc/B.Pm) sugiriendo un balance de remodelado negativo respecto al grupo Sham. La PTHrP (1-36) revirtió los valores de todos estos parámetros hasta niveles similares al Sham. Los ratones tratados con PTHrP (107-139), sin embargo, mostraron unas bandas de osteoide de mayor volumen y anchura (OV/BV y O.Th) que las de los Sham y OVX, y un mayor retardo en la mineralización (Mlt), como resultado de una baja velocidad de mineralización, y una tasa de formación ósea similar a la del grupo OVX (BFR/BS). Este fragmento de la PTHrP indujo además una inhibición de la actividad

osteoclástica, asociada a un número de osteoclastos inferior al de los ratones Sham.

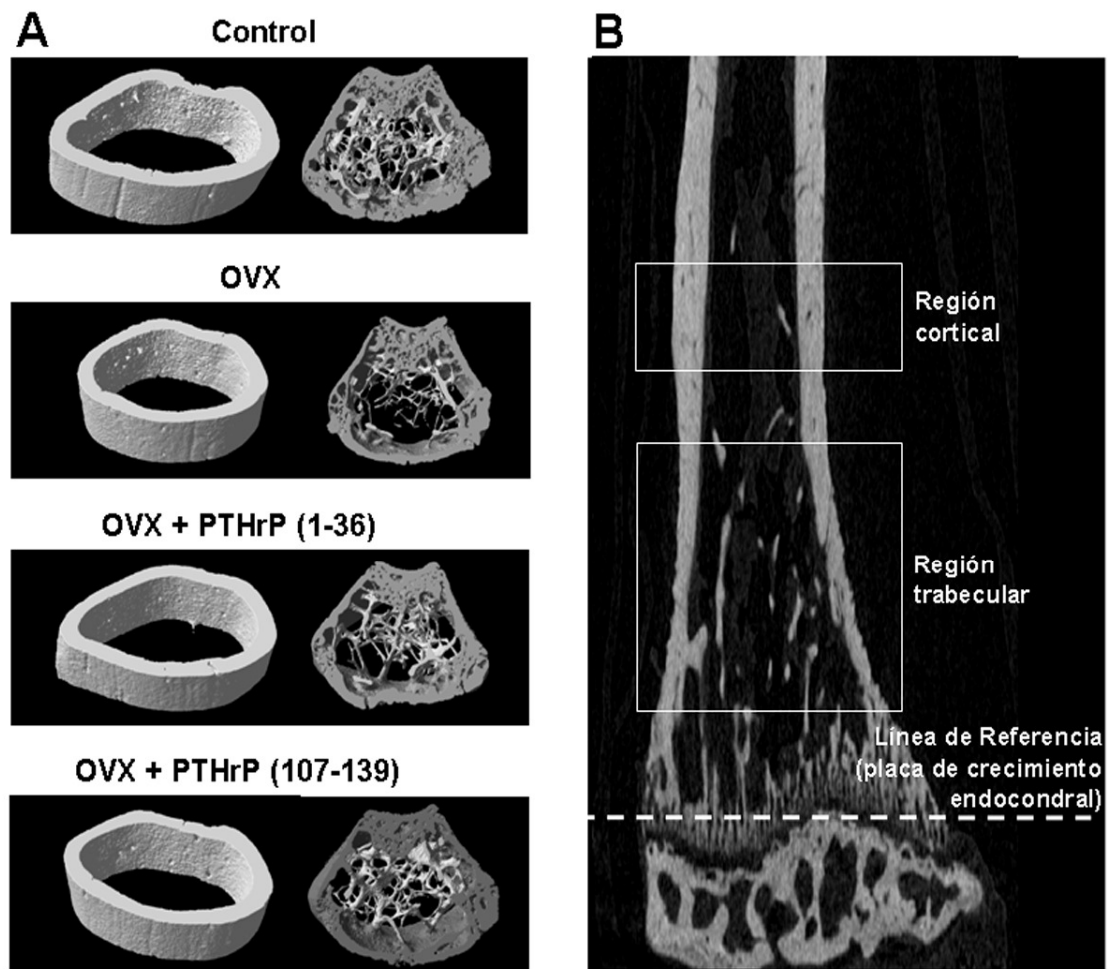
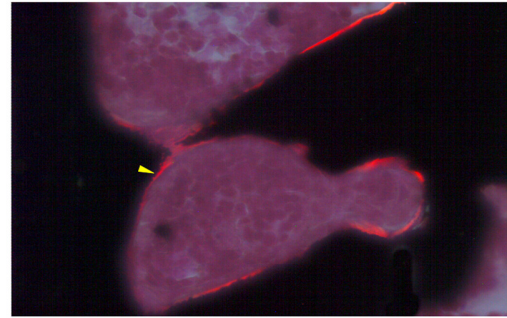
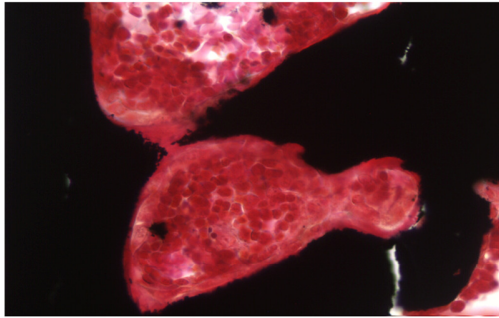


Figura 15. (A) Imágenes representativas de  $\mu$ CT del área cortical y trabecular de los distintos grupos experimentales tras 8 semanas de tratamiento con los péptidos de la PTHrP ó su vehículo (12 semanas desde la OVX). (B) Imagen longitudinal del fémur distal intacto por  $\mu$ CT mostrando los sectores cortical y trabecular utilizados para el análisis.

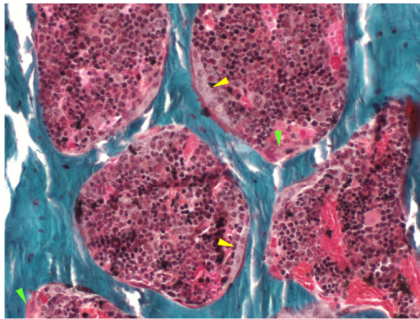
Los cultivos primarios de osteoprogenitores de la médula ósea de los ratones OVX revelaron una capacidad de proliferación inferior a los del grupo Sham, y una menor diferenciación, reflejada tanto en área positiva para ALP (Fig. 17 A) a los 14 días de la siembra, como en la capacidad de mineralización de las colonias tras 21 días de cultivo. El tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP revirtió estos efectos provocados por la depleción estrogénica en los cultivos *ex vivo*.



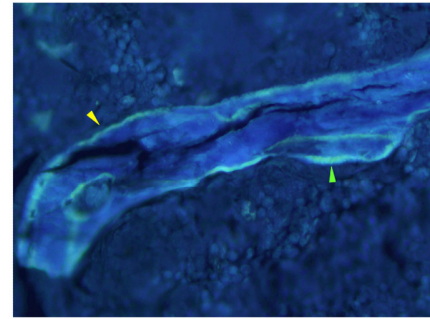
A



B



C



D

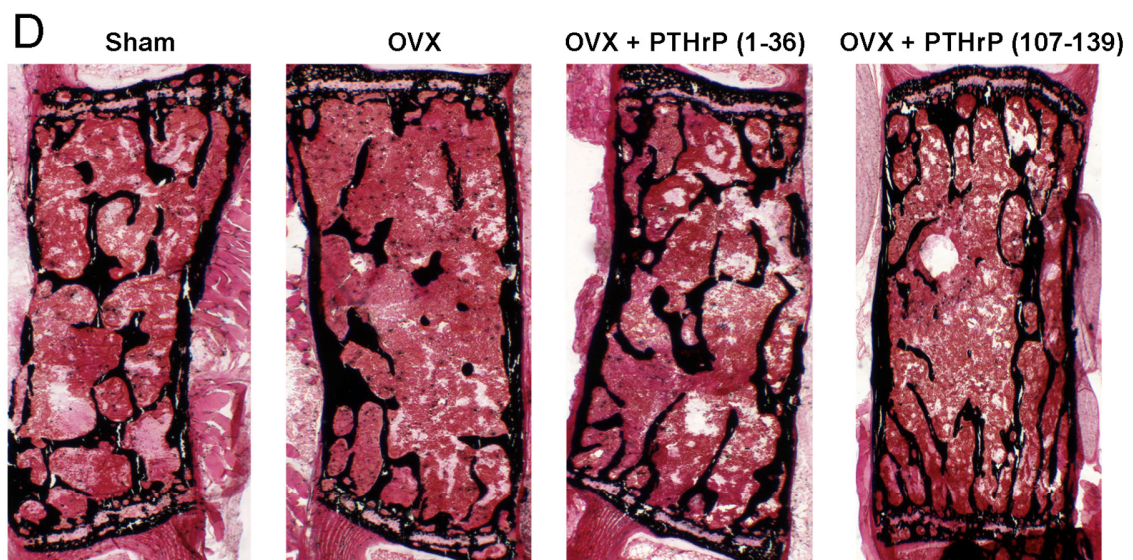


Figura 16. (A) Imágenes ilustrativas del hueso trabecular de las vértebras teñido por tinción de Von Kossa bajo luz normal (izquierda) y polarizada (derecha), en la que se aprecian los ribetes de osteoide (flecha amarilla). (B) Imagen ilustrativa de la tinción de Goldner en estas mismas muestras, en la que se aprecian osteoblastos (flecha amarilla) y osteoclastos (flecha verde). (C) Imagen de fluorescencia mostrando marcajes dobles (flecha verde) y simples (flecha amarilla) marcados con demeclociclina (inyectada al ratón 8 y 2 días antes del sacrificio). (D) Imágenes representativas de cada grupo experimental de una sección transversal de la vértebra L1 con tinción de Von Kossa.

Tabla 6. Parámetros histomorfométricos de las vértebras L1-L4 de ratón y las alteraciones inducidas tras 12 semanas de OVX ó Sham y 8 semanas de tratamiento con PTHrP (1-36) o PTHrP (107-139)

		Sham	OVX	OVX+ PTHrP (1-36)	OVX+ PTHrP (107-139)
Parámetros estáticos de formación ósea	OV/BV (%)	1,27 ±0,27	0,53±0,07*	1,39±0,20 <sup>#</sup>	2,38±0,53 <sup>*,##</sup>
	O.Th (µm)	4,17±0,75	3,93±1,01	5,01±0,50	8,09±1,05 <sup>*,#</sup>
Parámetros estáticos de resorción ósea	ES/BS (%)	5,65±1,06	7,78±0,47*	4,83±1,38 <sup>#</sup>	3,14±0,23 <sup>##</sup>
	Oc.S/BS (%)	0,67±0,16	2,43±0,60 <sup>**</sup>	1,01±0,26 <sup>#</sup>	0,43±0,18 <sup>##</sup>
	N.Oc/B.Pm (n <sup>o</sup> /mm <sup>2</sup> )	0,26±0,04	0,48±0,07*	0,28±0,05 <sup>#</sup>	0,11±0,05 <sup>*,#</sup>
Parámetros dinámicos de formación ósea	BFR/BS (µm/día)	0,12±0,03	0,07±0,01 <sup>**</sup>	0,13±0,01 <sup>##</sup>	0,07±0,01*
	MS/BS (%)	15,26±1,22	9,34±1,71*	13,11±0,58 <sup>#</sup>	7,25±1,59*
	Mlt (días)	6,84±0,34	8,52±1,31	6,35±0,22	15,52±3,24 <sup>*,#</sup>

OV/BV, Volumen de osteoide; O.Th, Anchura media de los ribetes trabeculares de osteoide; ES/BS, Superficie relativa de resorción; Oc.S/BS, Superficie relativa de resorción activa; N.Oc/B.Pm, Índice osteoclástico; BFR/BS, Grado de formación ósea referido a la superficie trabecular; MS/BS, Superficie relativa de formación activa instantánea; Mlt, Tiempo medio de retardo de la mineralización. Los valores son medias ± EEM de 5 animales por grupo. \*p<0,05; \*\*<0,01 vs Sham; #p<0,05; ## <0,01 vs OVX.

En el tejido duro de la tibia, observamos que la OVX provocó un descenso significativo de los marcadores de diferenciación osteoblástica analizados (Runx2, OSX y OC) (fig 18). La OVX, sin embargo, no modificó significativamente la expresión génica de SOST, un inhibidor de la formación ósea, a ningún tiempo estudiado, aunque sí del modulador de la vía Wnt/β-

catenina DKK-1. En general, los tratamientos con ambos péptidos de la PTHrP recuperaron los niveles de expresión de Runx2, OSX y OC durante todo el periodo de tratamiento. Además, ambos péptidos disminuyeron significativamente los niveles de los inhibidores SOST y Dkk1, de forma más intensa con el tratamiento con PTHrP (107-139), por debajo de los del grupo Sham. En cuanto a la expresión génica de OPG y RANKL, moduladores osteoblásticos de la diferenciación y activación osteoclástica (Fig. 19), la OVX

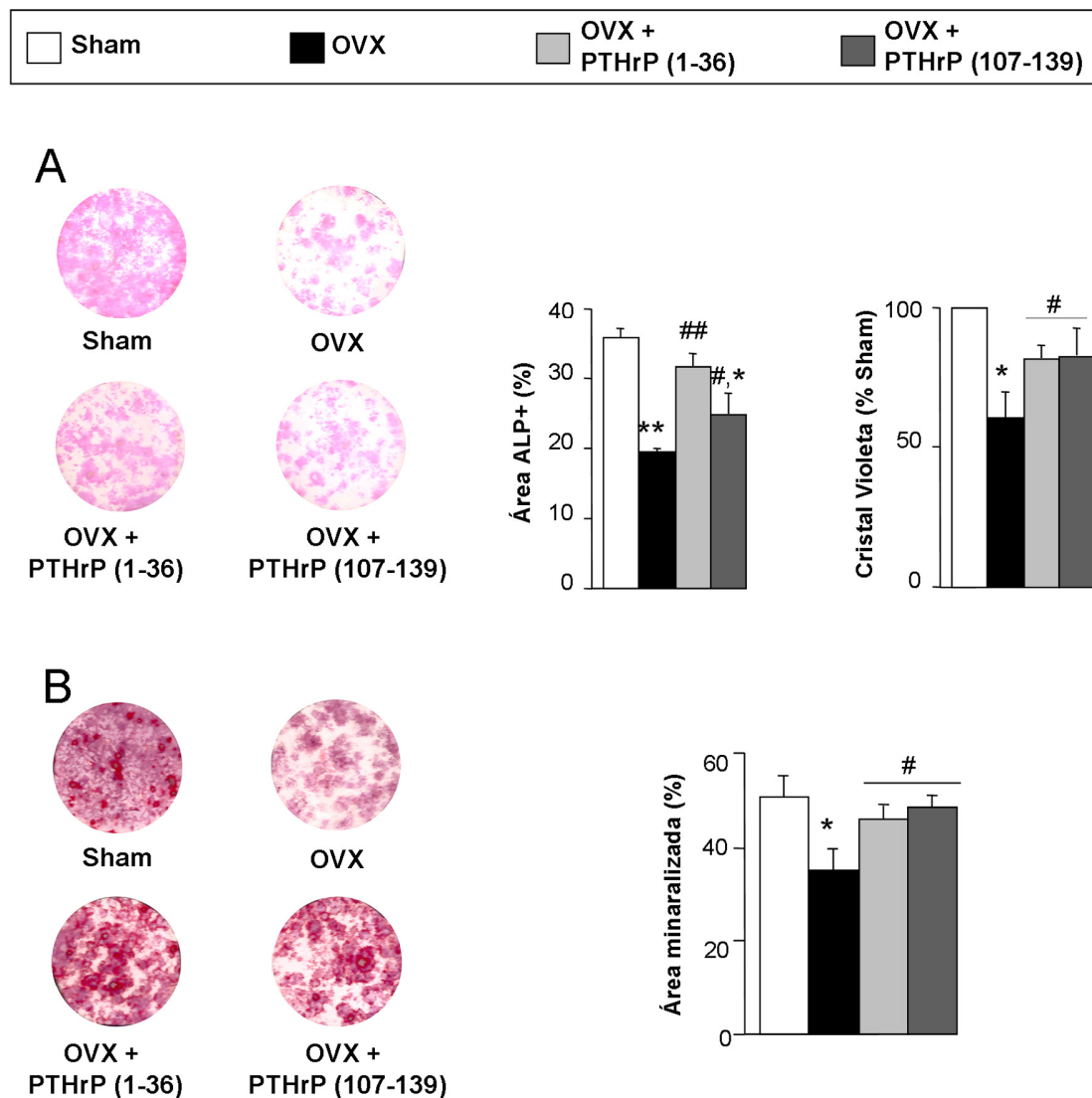


Figura 17. (A) Cuantificación de colonias positivas para ALP y de colonias totales (por tinción de cristal violeta) tras 14 días de cultivo primario de las células estromales de las tibias y fémures en los distintos grupos de ratones (B) Área mineralizada (por tinción de rojo de alizarina) tras 21 días de cultivo celular. Se muestran imágenes representativas en cada caso. Los valores son medias  $\pm$  EEM de 8-10 cultivos independientes por cada grupo experimental. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs Sham; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs OVX.

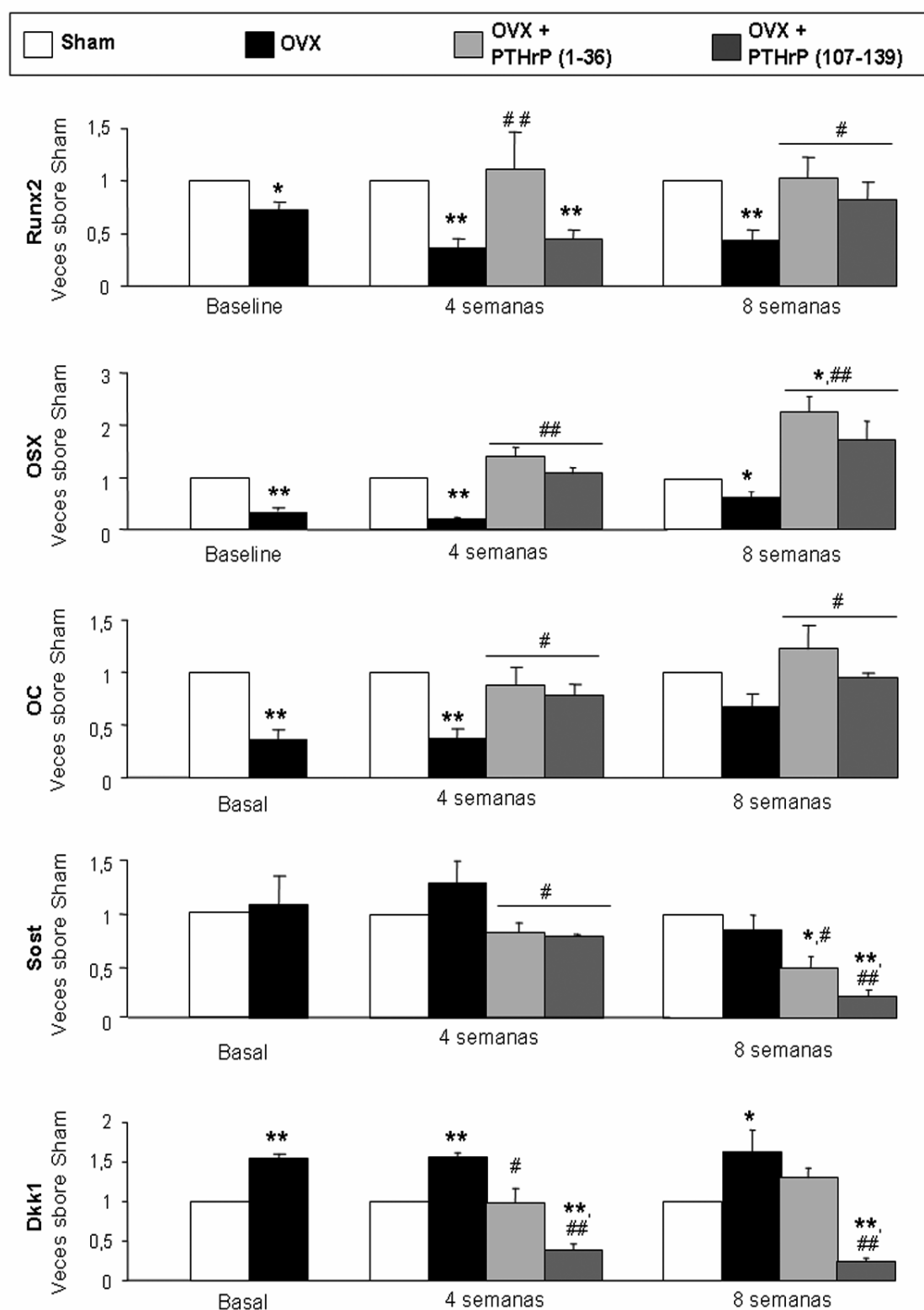


Figura 18. Expresión de diversos marcadores de diferenciación y regulación osteoblástica en la tibia de los distintos grupos experimentales tras 4 ó 8 semanas de tratamiento con PTHrP (8 ó 12 semanas desde Ovx respectivamente). Expresión génica de Runx2, OSX, OC, Sost, Dkk1. Los valores se expresaron como media  $\pm$  EEM de 5-10 ratones por grupo experimental. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs respectivo Sham; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs OVX respectivo.

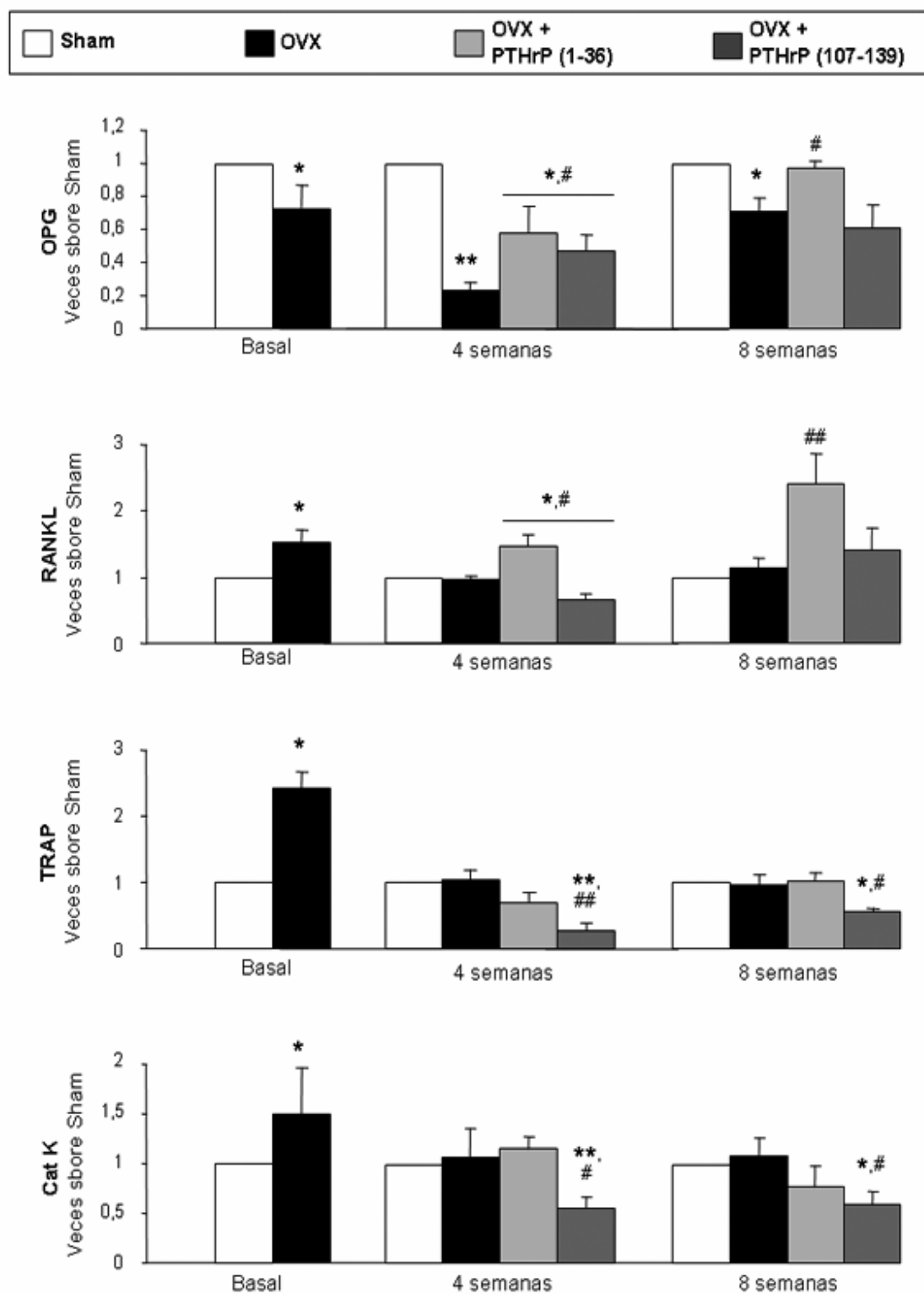


Figura 19. Expresión de diversos marcadores diferenciación y regulación osteoclástica en la tibia de los distintos grupos experimentales tras 4 ó 8 semanas de tratamiento con PTHrP (8 ó 12 semanas desde OvX respectivamente). Expresión génica de OPG, RANKL, TRAPc y Cat. Los valores se expresaron como media  $\pm$  EEM de 5-10 ratones por grupo experimental. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs respectivo Sham; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs respectivo OVX.

indujo una disminución de OPG a todos los tiempos estudiados, aunque solo provocó un aumento de RANKL en el grupo basal (a las 4 semanas de la OVX). A este tiempo, la OVX provocó un aumento de expresión de TRAP y Cat K, proteínas implicadas funcionalmente en la resorción ósea, aunque este efecto no se observó posteriormente. El tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP durante 4 semanas aumentó la expresión génica de OPG en el grupo OVX, sin llegar a los niveles de Sham, aunque a las 8 semanas sólo la PTHrP (1-36) se mostró eficaz en este sentido. En cuanto al RANKL, el fragmento N-terminal de la PTHrP aumentó significativamente sus niveles por encima de los observados en los grupos Sham y OVX a 4 y 8 semanas; mientras que el fragmento 107-139 inhibió la expresión de este marcador a las 4 semanas de tratamiento, pero no a las 8. Este fragmento disminuyó la expresión de TRAP y Cat K por debajo de los niveles basales, de modo coherente con sus propiedades antiresortivas.

Además, en vista de la reciente importancia que se atribuye a la secreción de esclerostina por parte de los osteocitos para regular la formación ósea, y de su modulación por agentes anabólicos como la PTH [8, 45], estudiamos los efectos de la OVX y los tratamientos con los péptidos de la PTHrP sobre la expresión proteica de este factor por inmunohistoquímica. Observamos un aumento significativo del número de osteocitos positivos para esclerostina en los ratones OVX respecto al grupo Sham; mientras que el tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP revirtió este efecto de la depleción estrogénica.

Respecto a los marcadores bioquímicos en plasma, ninguno de los grupos experimentales mostró diferencias significativas en los niveles de calcio, fósforo o creatinina al comienzo ni al final de los tratamientos (tabla 7). El marcador de formación ósea OC (Fig. 21A) mostró una tendencia no significativa a disminuir en el grupo OVX respecto al Sham a las 8 y 12 semanas tras la operación ( $p=0.08$  y  $0.1$ , respectivamente;  $n=4-8$ ). La concentración plasmática de PYD, un marcador de resorción ósea (Fig. 21B), mostró unos valores mayores en el grupo OVX a ambos tiempos estudiados. Estos resultados indican un desacoplamiento entre la formación y la resorción óseas, como efecto de la depleción estrogénica en nuestro modelo. El



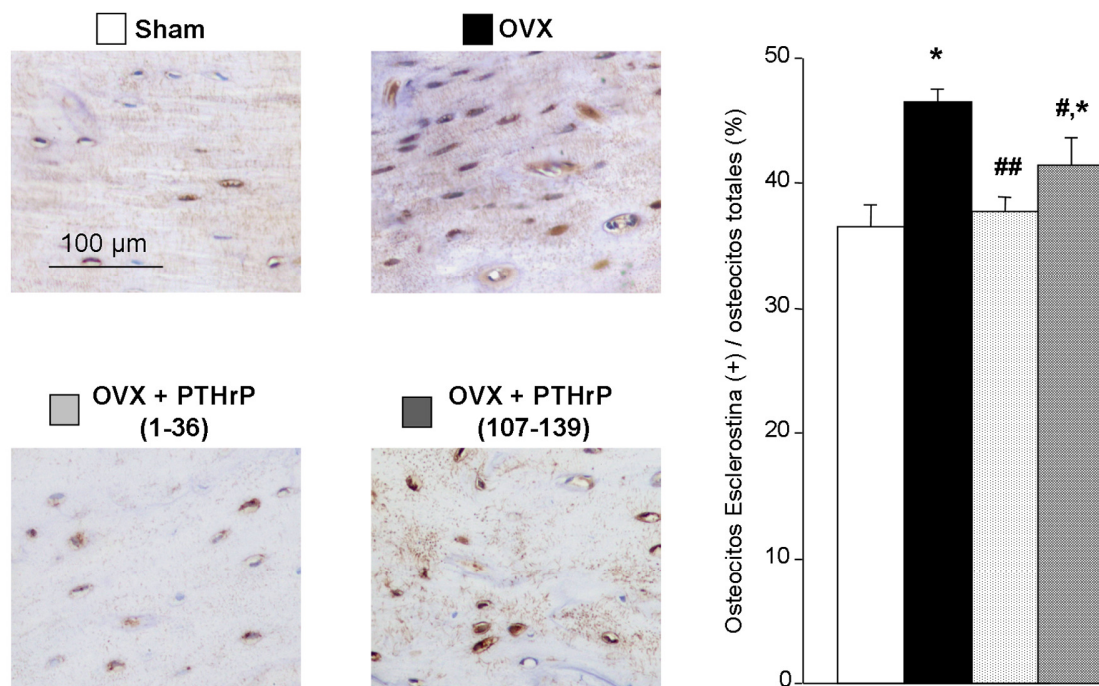


Figura 20. Imágenes representativas y cuantificación de los osteocitos totales y positivos para esclerostina en la tibia de ratón en los distintos grupos experimentales. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM de 5-8 ratones por grupo experimental. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs Sham; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs OVX.

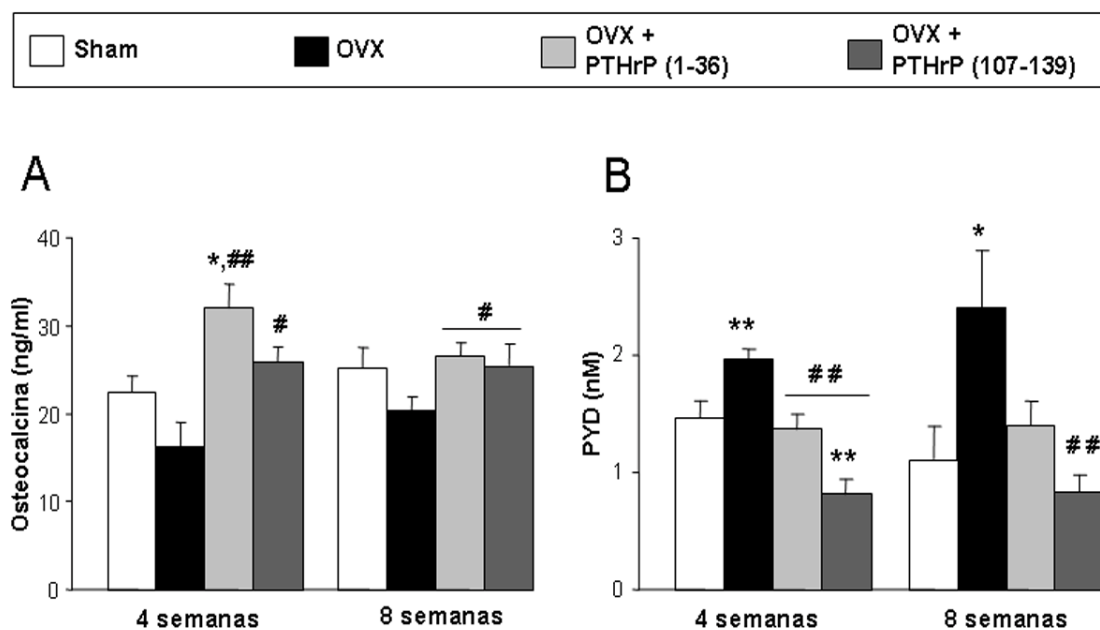


Figura 21. Niveles del marcador de formación ósea osteocalcina (A) y del marcador de resorción PYD (B) en el suero de los ratones de los distintos grupos experimentales. Los valores se expresan como media  $\pm$  EEM de 6-8 ratones por grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs Sham; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs OVX.

Tabla 7. Niveles plasmáticos de calcio, fósforo y creatinina

		<b>Fósforo (mg/dl)</b>	<b>Calcio (mg/dl)</b>	<b>Creatinina (mg/dl)</b>
<b>Basal</b>	<b>Sham</b>	7,1±0,0	6,80±0,1	0,20±0,00
	<b>OVX</b>	6,9±0,1	7,05±0,1	0,30±0,05
<b>4 semanas</b>	<b>Sham</b>	7,8±0,1	8,6±0,1	0,31±0,09
	<b>OVX</b>	7,9±0,6	8,2±0,3	0,32±0,03
	<b>OVX + PTHrP (1-36)</b>	7,0±0,3*	8,9±0,1	0,31±0,03
	<b>OVX + PTHrP (107-139)</b>	7,4±0,3	8,8±0,1	0,28±0,03
<b>8 semanas</b>	<b>Sham</b>	7,0±0,6	8,5±0,2	0,40±0,01
	<b>OVX</b>	7,4±1,1	7,8±0,3	0,33±0,06
	<b>OVX + PTHrP (1-36)</b>	7,2±0,2	7,7±0,3	0,35±0,07
	<b>OVX + PTHrP (107-139)</b>	6,9±0,7	8,2±0,4	0,38±0,03

Los datos son presentados como media ± EEM de 5 ratones por grupo. \*p<0,05 vs OVX

tratamiento con PTHrP (1-36) en los ratones OVX incrementó significativamente la concentración de OC y disminuyó los niveles de PYD, mientras que la PTHrP (107-139) también ejerció efectos antagónicos a los de la depleción estrogénica, mostrando una intensa acción inhibitoria sobre la concentración de PYD, inferior a la del grupo Sham.



# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

### Modelo de regeneración ósea en ratones tratados con GCs

Los GCs provocan una pérdida de masa ósea a través de mecanismos complejos, que incluyen una alteración en la absorción y excreción de calcio [95]. Sin embargo, los GCs también actúan directamente sobre las células óseas, aumentando la resorción e inhibiendo la formación ósea. Este último efecto se asocia a un aumento de la apoptosis de las células osteoblásticas y a una inhibición de su diferenciación [11, 19, 103].

En nuestro modelo, la administración de 3-Mpred reprodujo en el hueso intacto del ratón las alteraciones observadas en otros modelos murinos de pérdida de masa ósea por exceso de GCs [98, 105, 152, 153] y en pacientes en situación de tratamiento con dosis altas y prolongadas de estos compuestos [90]. De hecho, mediante el análisis con  $\mu$ CT en el fémur intacto, observamos en los ratones tratados con 3-Mpred una disminución de parámetros estructurales óseos, tanto a nivel cortical como trabecular. Este hecho es coherente con los resultados de otros estudios realizados con tratamientos más prolongados con dexametasona o prednisolona en ratón [152, 153].

Nuestros resultados demuestran además que la 3-Mpred inhibe la regeneración ósea tras la ablación de la médula ósea en la tibia del ratón, en relación a una disminución en la capacidad de diferenciación osteogénica de los osteoprogenitores presentes en este escenario. En nuestro estudio preliminar, en el grupo de ratones control, observamos en los cultivos primarios de células estromales de la médula ósea una disminución del número de colonias totales formadas *ex vivo*, así como de su capacidad de mineralización, a medida que avanzaba el proceso de regeneración ósea (entre los 8 y 16 días). Esto puede explicarse por una disminución de la cantidad de osteoprogenitores activos a lo largo del proceso regenerativo, más abundantes entre los 8 y 12 días desde la ablación medular que a tiempos más tardíos (Fig. 3) [138]. De hecho, a los 16 días de regeneración, las colonias formadas en el grupo control disminuyeron de tamaño, indicando una menor capacidad

proliferativa de estas células. Por el contrario, en los ratones tratados con el GC, el número de colonias de osteoprogenitores obtenidas tras la ablación aumentó a lo largo de la regeneración, aunque su capacidad de mineralización permaneció disminuida y constante a todos los tiempos estudiados. Esto puede reflejar un retraso inducido por el GC sobre la diferenciación de los precursores osteoblásticos en la tibia tras la ablación de médula, como se ha demostrado previamente en ratas [141].

En este estudio también observamos una disminución de la expresión de ARNm de la OC en la tibia en regeneración de los ratones tratados con el GC. En este sentido, en la literatura se han descrito en ratones niveles bajos de OC circulante tras el tratamiento con GCs [102, 104, 152, 153]. Asimismo, la expresión génica de marcadores tempranos de osteoblastogénesis como Runx2, OSX y ALP también resultó inhibida por el tratamiento con 3-Mpred en esta situación. Por el contrario, la expresión de Ap2 aumentó en la tibia en regeneración de los ratones tratados con el GC, de manera concordante con resultados recientes que demuestran que los factores que controlan la osteoblastogénesis afectan a la adipogénesis de manera contrapuesta en el entorno óseo [150].

El factor angiogénico VEGF y sus receptores resultaron disminuidos durante la regeneración ósea en los ratones tratados con 3-Mpred, en concordancia con resultados previos *in vivo* en un escenario no regenerativo [108]. Datos previos de nuestro grupo demuestran una disminución paralela en la producción de PTHrP y VEGF en células osteoblásticas humanas asociada a la edad del donante [154]. En estas células, además, la PTHrP es capaz de estimular al sistema del VEGF [77, 79, 132], lo que sugiere que la disminución de la PTHrP producida por el GC, debe ser responsable, al menos en parte, de la disminución paralela del sistema del VEGF observada en nuestro modelo. En este contexto, se debe destacar que recientemente se le ha atribuido al VEGF un papel clave en la regulación coordinada de la angiogénesis y la formación ósea en otro modelo de regeneración ósea en el ratón [155]. De hecho, en nuestro estudio hemos observado una disminución en el número de vasos sanguíneos en la tibia en regeneración de los ratones tratados con 3-Mpred.

Diversos estudios in vitro han mostrado una inhibición de OPG acompañada de una inducción de RANKL provocada por GCs en osteoblastos humanos. Sin embargo, otros autores no han observado estos efectos en preparaciones de osteoblastos murinos [99, 100]. En nuestro estudio in vivo hemos encontrado en la tibia en regeneración de ratones tratados con 3-Mpred una disminución tanto en el ARNm de OPG como de RANKL similar al control, manteniéndose estable la relación OPG/RANKL. Teniendo en cuenta el papel que este cociente tiene en la osteoclastogénesis, no es sorprendente que el número total de células positivas para CTR y TRAP (incluyendo precursores multinucleares de los osteoclastos) no se vió modificado en la tibia post-ablación de estos ratones. En este contexto, es interesante destacar el aumento de la abundancia relativa de células multinucleadas positivas para ambos marcadores (osteoclastos maduros) en los ratones tratados con el GC, similar al observado en otros estudios en el hueso intacto de ratón [97, 98, 104]. Considerando que la actividad osteoclástica parece esencial para el mantenimiento de la formación ósea [49], nuestros resultados podrían indicar que la deficiente regeneración ósea inducida por la 3-Mpred podría deberse en parte a una disminución de la actividad osteoclástica en este modelo. En este contexto, estudios recientes han demostrado que la acción inhibitoria de los GCs sobre la actividad osteoclástica es clave para sus efectos deletéreos en la formación ósea [100, 104, 141].

En este modelo, hemos observado un menor número de osteocitos positivos para esclerostina en el hueso cortical de la tibia en regeneración de los ratones tratados con 3-Mpred, que podría explicarse por un incremento en su tasa de apoptosis, como se ha sugerido previamente [102, 103]. En apoyo de esta hipótesis, mediante la determinación del número de lagunas osteocíticas vacías, método utilizado previamente para deducir la apoptosis osteocítica [156], encontramos una mayor abundancia relativa de estas lagunas en el hueso cortical de los ratones que recibieron el GC respecto a los controles.

La administración diaria del fragmento 1-36 de la PTHrP durante 16 días, revirtió los efectos deletéreos causados por la 3-Mpred en la metáfisis femoral,

un hallazgo coherente con el efecto anabólico óseo de este fragmento en otros modelos [65-67]. Un tratamiento similar con el fragmento 107-139 de la PTHrP en estos ratones compensó los efectos deletéreos del GC sobre el hueso cortical, mejorando también la alineación trabecular, aunque no el resto de los parámetros trabeculares estudiados. Este efecto predominantemente cortical de la región C-terminal de la PTHrP se ha observado previamente en un modelo de osteoporosis experimental en ratas [65].

En la tibia en regeneración, sin embargo, ambos péptidos se mostraron igualmente eficaces para recuperar las alteraciones inducidas por la 3-Mpred en el número y la función de los osteoblastos y osteocitos, así como en la angiogénesis y la adipogénesis, así como en la diferenciación y mineralización *ex vivo* de los osteoprogenitores extraídos de la médula ósea de estos ratones. Por otro lado, ambos péptidos evitaron la formación de osteoclastos maduros, presumiblemente a costa de una normalización de los niveles de OPG, y no de sus acciones sobre la expresión de RANKL. Este hecho es compatible con las acciones antirresortivas conocidas de la PTHrP (107-139) [72-76], y con el hecho de que los efectos osteogénicos de la PTHrP (1-36) parecen tener lugar independientemente de la resorción ósea [66, 157]. Además, el fragmento N-terminal aumentó la expresión del VEGFR1 y no el VEGFR2, al contrario que la PTHrP (107-139); lo que está a favor de la hipótesis de que cada dominio de la PTHrP parece modular el sistema VEGF de un modo específico, según datos recientes de nuestro grupo [77, 79].

## **Modelo de osteoporosis en ratones OVX**

Estudios previos en ratas OVX han mostrado efectos osteogénicos de la PTHrP (1-34) y de la PTHrP (107-111) u *osteostatina* a dosis similares a las utilizadas en el presente estudio a corto plazo (13 días) [65], así como de la PTHrP (1-36) a largo plazo (6 meses) [67]. Además, este último fragmento ha demostrado su eficacia para mejorar la masa ósea en mujeres postmenopáusicas a los 3 meses de tratamiento, con efectos comparables a los de dosis similares de PTH (1-34) [66]. En este estudio, se demuestra por vez primera una reversión de los efectos negativos provocados por la depleción

estrogénica en el hueso de ratones OVX por ambos fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP.

Según nuestros resultados, los ratones Sham mostraron una tendencia a aumentar la DMO (del cuerpo total y femoral) a lo largo del estudio, realizado entre las 16 y las 24 semanas de edad. Aunque en este rango de edad los ratones son considerados adultos, incluso en el periodo de madurez se observa en distintas cepas de ratones un cierto incremento de la DMO [1]. El diseño de nuestro protocolo experimental tuvo en cuenta este hecho y se decidió utilizar ratones de 12 semanas porque a partir de esta edad el ritmo de aumento de DMO se ralentiza y permanece constante en la cepa de ratones utilizada (C57BL/6J) [1, 158]. En estos animales, como era de esperar, la OVX provocó un descenso significativo de la DMO entre las 6 y 12 semanas tras la operación en las localizaciones esqueléticas estudiadas. De acuerdo a datos previos en ratones, el análisis de microarquitectura ósea por  $\mu$ CT mostró efectos catabólicos más pronunciados de la OVX sobre el hueso trabecular que en el cortical del fémur en nuestro modelo [158, 159]. En cuanto a los efectos de la OVX sobre el remodelado óseo, observamos un incremento de la concentración plasmática del marcador de resorción PYD en los ratones OVX, coherente con los resultados del estudio histomorfométrico de las vértebras lumbares de estos ratones, en las que detectamos un incremento del número de osteoclastos y de su actividad. En este sentido, cabe destacar que aunque en la tibia de estos animales existía una expresión incrementada de los marcadores de actividad osteoclástica TRAP y Cat K tras 4 semanas de la OVX, este efecto se perdió más adelante en el periodo estudiado. Además, se observó un aumento transitorio de la expresión de RANKL, pero un efecto inhibitor sobre la OPG, lo que da lugar a una disminución de la relación OPG/RANKL en el periodo estudiado tras la OVX, compatible con la activación de la osteoclastogénesis. Por otra parte, en nuestro modelo la OVX afectó negativamente a la formación ósea, disminuyendo significativamente la tasa de formación ósea y el volumen de osteoide a nivel trabecular en las vértebras, y provocando en la tibia una depleción de genes de diferenciación osteoblástica (Runx2, OSX) y una activación de DKK-1, inhibidor de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Aunque la expresión del gen Sost, otro inhibidor endógeno de esta vía de

señalización, no se incrementó significativamente en la tibia por la depleción estrogénica, como se ha observado previamente en ratas [45], sí observamos un aumento del número de osteocitos que expresan esclerostina, el producto proteico de Sost. Ese hecho sugiere una posible regulación postranscripcional de esta proteína por los estrógenos. Además, observamos una disminución de la expresión génica de OC en la tibia, unido a una tendencia a la disminución de este marcador a nivel plasmático, en contraste con estudios previos en ratones, en los que la concentración de OC no muestra cambios [160] o aparece incrementada en la OVX [161, 162]. Por otro lado, la OVX también inhibió la capacidad de proliferación y de diferenciación *ex vivo* de los osteoprogenitores de la médula ósea de estos ratones, lo que apoya los efectos deletéreos de la OVX observados sobre la formación ósea en nuestro modelo.

La administración intermitente de PTHrP (1-36) a los ratones OVX indujo un aumento de la DMO en todas las regiones óseas estudiadas. El estudio más pormenorizado de la microarquitectura ósea por  $\mu$ CT reveló una mejora significativa tanto en el hueso cortical como trabecular, especialmente patente en los parámetros relacionados con la estructura trabecular (SMI, Tb. Pf) y en la resistencia cortical (MMI) en el fémur de estos ratones. En la tibia de estos animales, el tratamiento con la PTHrP (1-36) no alteró los niveles de expresión de los marcadores osteoclásticos Cat K y TRAP, ni produjo un efecto significativo sobre el eje OPG/RANKL, al inducir un aumento similar de ambos factores. Sin embargo, la histomorfometría mostró una reversión de la elevada actividad resortiva asociada a la OVX hasta niveles similares al grupo Sham, efecto apoyado por los niveles de PYD circulantes observados. La acción anabólica de la PTHrP (1-36) se confirmó mediante la evaluación de los parámetros histomorfométricos dinámicos y estáticos de formación ósea en las vértebras, observándose además un drástico incremento de los niveles séricos de OC y de la expresión génica de este marcador en la tibia de los ratones tratados con este fragmento de la PTHrP. Así mismo, la expresión de los marcadores tempranos de diferenciación osteoblástica Runx2 y OSX en la tibia de estos ratones mostró un incremento respecto al grupo OVX y en ocasiones, incluso respecto al grupo Sham. Además, de forma similar a lo observado para

PTH (1-34) [45], la PTHrP (1-36) inhibió la expresión de esclerostina, tanto a nivel transcripcional (por PCR a tiempo real) como proteico (por inmunohistoquímica) en la tibia de estos ratones. Por último, también observamos un efecto estimulador de éste péptido sobre la proliferación y diferenciación en los cultivos *ex vivo* de osteoprogenitores de la médula ósea de la tibia y fémur de estos ratones tratados con el péptido. Todos estos datos en conjunto demuestran el efecto anabólico de la PTHrP (1-36), similar al observado en otros modelos de roedores con la PTH (1-34).

En los ratones OVX tratados con una dosis de PTHrP (107-139) similar a la utilizada con el péptido N-terminal de la PTHrP durante 2 semanas, observamos un efecto transitorio de este péptido sobre la DMO femoral y de cuerpo total, pero no a nivel vertebral. Sin embargo, el análisis por  $\mu$ CT de la estructura femoral distal de estos ratones mostró efectos similares a los de la PTHrP (1-36) a las 8 semanas de tratamiento. Esta aparente disparidad entre los datos de DEXA y  $\mu$ CT en los ratones tratados con PTHrP (107-139) podría explicarse si consideramos que la técnica de DEXA posee una menor sensibilidad que otras técnicas como  $\mu$ CT o pqCT (tomografía computerizada cuantitativa periférica), al proyectar la imagen ósea sobre una superficie bidimensional, en lugar de hacer una reconstrucción del volumen óseo como estas últimas. Por ello, la DEXA no permite observar cambios sutiles en la masa ósea [164], ni analizar ningún parámetro estructural para evaluar la calidad ósea en los ratones. En cambio, la utilización de  $\mu$ CT nos ha permitido evidenciar efectos positivos de la PTHrP (107-139) tanto a nivel cortical como trabecular en el fémur. A este respecto, cabe mencionar que el único trabajo previo publicado con una dosis molar similar de *osteostatina*, mostró un efecto osteoformador únicamente a nivel del hueso cortical de ratas OVX a las 2 semanas de tratamiento [65]; lo que apoya la acción precoz de la PTHrP (107-139) en nuestros ratones, observada por DEXA en la DMO del fémur, hueso con un contenido mayoritariamente cortical.

Por otro lado, los datos de histomorfometría estática y dinámica de las vértebras lumbares de los ratones tratados con PTHrP (107-139) no mostraron al final del tratamiento una tasa de formación ósea superior a la del grupo no



tratado de ratones con OVX. Esta aparente ausencia de efectos anabólicos del péptido se debió posiblemente a un retraso en la actividad mineralizadora de los osteoblastos y no en su capacidad de síntesis de matriz proteica, como indica la valoración del osteoide, muy superior a la de los demás grupos experimentales. Sin embargo, las células osteoprogenitoras de los huesos largos de los ratones tratados con PTHrP (107-139) muestran una recuperación de la capacidad de mineralización *ex vivo*, coherente con los efectos osteoformadores observados por  $\mu$ CT en el fémur y con el aumento observado en la tibia en la expresión de varios marcadores de diferenciación osteoblásticos. Estos resultados indican un distinto comportamiento de la PTHrP (107-139) en función de la localización esquelética (hueso axial o apendicular), como se ha descrito para la PTH (1-34) en ratones [158, 159]. Apoyando la importancia de los efectos anabólicos óseos de la PTHrP (107-139), el tratamiento con este péptido indujo un aumento de los niveles plasmáticos de osteocalcina, marcador clave de formación ósea [51]. Además, el tratamiento con la PTHrP (107-139) produjo un incremento de la expresión de genes osteoblastogénicos (Runx2, OSX y OC), además de una intensa inhibición de DKK-1 y de Sost; así como una disminución del número de osteocitos positivos para esclerostina en la tibia de los ratones con OVX tratados con el péptido. Por otro lado, en consonancia con los efectos antirresortivos atribuidos al dominio C-terminal de la PTHrP [72-76], observamos por histomorfometría de las vértebras L1-L4 una inhibición del reclutamiento y la actividad osteoclástica; así como de los genes osteoclásticos TRAP y Cat K en la tibia y de los niveles plasmáticos de PYD en los ratones tratados con la PTHrP (107-139).

Todos estos datos en conjunto demuestran que la PTHrP (107-139) ejerce una acción antirresortiva y anabólica combinada sobre el metabolismo óseo en situación de pérdida de masa ósea por depleción estrogénica en el ratón; aunque sugieren que, al menos su acción anabólica, podría variar en función a la localización o tipo de hueso analizado.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis doctoral, llegamos a las siguientes conclusiones:

1.- Se confirma la validez del modelo de regeneración ósea tras la ablación medular para evidenciar los efectos deletéreos del tratamiento agudo con 3-Mpred sobre el proceso regenerativo óseo en el ratón.

2.- Los fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP ejercen efectos osteogénicos similares sobre la regeneración ósea en este modelo.

3.- Utilizando la técnica de  $\mu$ CT, este modelo nos ha permitido describir un efecto negativo del GC sobre la calidad del hueso intacto y demostrar el efecto positivo de ambos fragmentos de la PTHrP sobre la calidad ósea, a través de sus acciones diferenciadas sobre el hueso cortical y trabecular.

4.- En un modelo murino de osteoporosis por depleción estrogénica, ambos fragmentos de la PTHrP ejercen acciones anabólicas óseas. Esta acción del fragmento C-terminal se acompaña de su efecto anti-resortivo.

**Aun considerando las limitaciones de un estudio experimental, los hallazgos de esta Tesis doctoral sugieren que ambos fragmentos de la PTHrP podrían constituir terapias alternativas para promover la regeneración ósea, así como compensar la pérdida de masa ósea en la osteoporosis.**

# BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

1. Li, C.Y., M.B. Schaffler, H.T. Wolde-Semait, C.J. Hernandez, and K.J. Jepsen, *Genetic background influences cortical bone response to ovariectomy*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(12): p. 2150-8.
2. Gonzalez Macías, J. and L. Olmos Martinez, *Introducción: Fisiopatología del remodelado óseo*, in *Formadores de Hueso*, X. Nogués, Editor. 2005, Scientific communication management: Barcelona. p. 13-25.
3. Weiner, S., W. Traub, and H.D. Wagner, *Lamellar bone: structure-function relations*. J Struct Biol, 1999. **126**(3): p. 241-55.
4. Parfitt, A.M., R. Travers, F. Rauch, and F.H. Glorieux, *Structural and cellular changes during bone growth in healthy children*. Bone, 2000. **27**(4): p. 487-94.
5. Franz-Odenaal, T.A., B.K. Hall, and P.E. Witten, *Buried alive: how osteoblasts become osteocytes*. Dev Dyn, 2006. **235**(1): p. 176-90.
6. Serrano, S., J. Aubia, and M. Mariñoso, *Patología ósea metabólica*. 1990, Barcelona: Sandoz S.A.E.
7. Finkelstein, J.S., A. Klibanski, E.H. Schaefer, M.D. Hornstein, I. Schiff, and R.M. Neer, *Parathyroid hormone for the prevention of bone loss induced by estrogen deficiency*. N Engl J Med, 1994. **331**(24): p. 1618-23.
8. O'Brien, C.A., L.I. Plotkin, C. Galli, J.J. Goellner, A.R. Gortazar, M.R. Allen, A.G. Robling, M. Bouxsein, E. Schipani, C.H. Turner, R.L. Jilka, R.S. Weinstein, S.C. Manolagas, and T. Bellido, *Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2942.
9. Fermor, B. and T.M. Skerry, *PTH/PTHrP receptor expression on osteoblasts and osteocytes but not resorbing bone surfaces in growing rats*. J Bone Miner Res, 1995. **10**(12): p. 1935-43.

10. Samura, A., S. Wada, S. Suda, M. Iitaka, and S. Katayama, *Calcitonin receptor regulation and responsiveness to calcitonin in human osteoclast-like cells prepared in vitro using receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and macrophage colony-stimulating factor*. Endocrinology, 2000. **141**(10): p. 3774-82.
11. Plotkin, L.I., R.S. Weinstein, A.M. Parfitt, P.K. Roberson, S.C. Manolagas, and T. Bellido, *Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin*. J Clin Invest, 1999. **104**(10): p. 1363-74.
12. Beresford, J.N., J.A. Gallagher, and R.G. Russell, *1,25-Dihydroxyvitamin D3 and human bone-derived cells in vitro: effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation*. Endocrinology, 1986. **119**(4): p. 1776-85.
13. Canalis, E., *The hormonal and local regulation of bone formation*. Endocr Rev, 1983. **4**(1): p. 62-77.
14. Owen, T.A., M.S. Aronow, L.M. Barone, B. Bettencourt, G.S. Stein, and J.B. Lian, *Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures*. Endocrinology, 1991. **128**(3): p. 1496-504.
15. Bellido, T., R.L. Jilka, B.F. Boyce, G. Girasole, H. Broxmeyer, S.A. Dalrymple, R. Murray, and S.C. Manolagas, *Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2886-95.
16. Colvard, D., T. Spelsberg, E. Eriksen, P. Keeting, and B.L. Riggs, *Evidence of steroid receptors in human osteoblast-like cells*. Connect Tissue Res, 1989. **20**(1-4): p. 33-40.
17. Jilka, R.L., G. Hangoc, G. Girasole, G. Passeri, D.C. Williams, J.S. Abrams, B. Boyce, H. Broxmeyer, and S.C. Manolagas, *Increased*

- osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6.* Science, 1992. **257**(5066): p. 88-91.
18. Manolagas, S.C., S. Kousteni, and R.L. Jilka, *Sex steroids and bone.* Recent Prog Horm Res, 2002. **57**: p. 385-409.
  19. Gohel, A., M.B. McCarthy, and G. Gronowicz, *Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro.* Endocrinology, 1999. **140**(11): p. 5339-47.
  20. Pun, K.K., P. Lau, and P.W. Ho, *The characterization, regulation, and function of insulin receptors on osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line.* J Bone Miner Res, 1989. **4**(6): p. 853-62.
  21. Akune, T., N. Ogata, K. Hoshi, N. Kubota, Y. Terauchi, K. Tobe, H. Takagi, Y. Azuma, T. Kadowaki, K. Nakamura, and H. Kawaguchi, *Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts.* J Cell Biol, 2002. **159**(1): p. 147-56.
  22. Ogata, N., D. Chikazu, N. Kubota, Y. Terauchi, K. Tobe, Y. Azuma, T. Ohta, T. Kadowaki, K. Nakamura, and H. Kawaguchi, *Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover.* J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 935-43.
  23. Inzerillo, A.M. and S. Epstein, *Osteoporosis and diabetes mellitus.* Rev Endocr Metab Disord, 2004. **5**(3): p. 261-8.
  24. Ohlsson, C., B.A. Bengtsson, O.G. Isaksson, T.T. Andreassen, and M.C. Sootweg, *Growth hormone and bone.* Endocr Rev, 1998. **19**(1): p. 55-79.
  25. Bassett, J.H. and G.R. Williams, *The molecular actions of thyroid hormone in bone.* Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(8): p. 356-64.
  26. Tartaglia, L.A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G.J. Richards, L.A. Campfield, F.T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker,

- A. Moriarty, K.J. Moore, J.S. Smutko, G.G. Mays, E.A. Wool, C.A. Monroe, and R.I. Tepper, *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1263-71.
27. Thomas, T., F. Gori, S. Khosla, M.D. Jensen, B. Burguera, and B.L. Riggs, *Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes*. Endocrinology, 1999. **140**(4): p. 1630-8.
28. Reseland, J.E., U. Syversen, I. Bakke, G. Qvigstad, L.G. Eide, O. Hjertner, J.O. Gordeladze, and C.A. Drevon, *Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(8): p. 1426-33.
29. Bonewald, L.F., *Mechanosensation and Transduction in Osteocytes*. Bonekey Osteovision, 2006. **3**(10): p. 7-15.
30. Papachroni, K.K., D.N. Karatzas, K.A. Papavassiliou, E.K. Basdra, and A.G. Papavassiliou, *Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease*. Trends Mol Med, 2009. **15**(5): p. 208-16.
31. Bakker, A.D., K. Soejima, J. Klein-Nulend, and E.H. Burger, *The production of nitric oxide and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent*. J Biomech, 2001. **34**(5): p. 671-7.
32. Bonewald, L.F. and M.L. Johnson, *Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling*. Bone, 2008. **42**(4): p. 606-15.
33. Verborgt, O., N.A. Tatton, R.J. Majeska, and M.B. Schaffler, *Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation?* J Bone Miner Res, 2002. **17**(5): p. 907-14.
34. Kamioka, H., T. Honjo, and T. Takano-Yamamoto, *A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy*. Bone, 2001. **28**(2): p. 145-9.



35. Miyakoshi, N., Y. Kasukawa, T.A. Linkhart, D.J. Baylink, and S. Mohan, *Evidence that anabolic effects of PTH on bone require IGF-I in growing mice*. Endocrinology, 2001. **142**(10): p. 4349-56.
36. Celil, A.B. and P.G. Campbell, *BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31353-9.
37. Ahdjoudj, S., F. Lasmoles, X. Holy, E. Zerath, and P.J. Marie, *Transforming growth factor beta2 inhibits adipocyte differentiation induced by skeletal unloading in rat bone marrow stroma*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(4): p. 668-77.
38. Yan, T., B.L. Riggs, W.J. Boyle, and S. Khosla, *Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF-beta1*. J Cell Biochem, 2001. **83**(2): p. 320-5.
39. Lee, K.S., H.J. Kim, Q.L. Li, X.Z. Chi, C. Ueta, T. Komori, J.M. Wozney, E.G. Kim, J.Y. Choi, H.M. Ryoo, and S.C. Bae, *Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(23): p. 8783-92.
40. Raisz, L.G., *Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology*. Osteoarthritis Cartilage, 1999. **7**(4): p. 419-21.
41. Zelzer, E. and B.R. Olsen, *Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair*. Curr Top Dev Biol, 2005. **65**: p. 169-87.
42. Kim, S.J., S.Y. Kim, C.H. Kwon, and Y.K. Kim, *Differential effect of FGF and PDGF on cell proliferation and migration in osteoblastic cells*. Growth Factors, 2007. **25**(2): p. 77-86.

43. Gaur, T., C.J. Lengner, H. Hovhannisyan, R.A. Bhat, P.V. Bodine, B.S. Komm, A. Javed, A.J. van Wijnen, J.L. Stein, G.S. Stein, and J.B. Lian, *Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33132-40.
44. Bennett, C.N., K.A. Longo, W.S. Wright, L.J. Suva, T.F. Lane, K.D. Hankenson, and O.A. MacDougald, *Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3324-9.
45. Keller, H. and M. Kneissel, *SOST is a target gene for PTH in bone*. Bone, 2005. **37**(2): p. 148-58.
46. Chambers, T.J., *Phagocytic recognition of bone by macrophages*. J Pathol, 1981. **135**(1): p. 1-7.
47. Matsuo, K. and N. Irie, *Osteoclast-osteoblast communication*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 201-9.
48. Gallagher, J.C., *Advances in bone biology and new treatments for bone loss*. Maturitas, 2008. **60**(1): p. 65-9.
49. Martin, T.J. and N.A. Sims, *Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption*. Trends Mol Med, 2005. **11**(2): p. 76-81.
50. Hauschka, P.V., A.E. Mavrakos, M.D. Iafrati, S.E. Doleman, and M. Klagsbrun, *Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose*. J Biol Chem, 1986. **261**(27): p. 12665-74.
51. Price, P.A., J.G. Parthemore, and L.J. Deftos, *New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease*. J Clin Invest, 1980. **66**(5): p. 878-83.
52. Fukumoto, S. and T.J. Martin, *Bone as an endocrine organ*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(5): p. 230-6.

53. Brekken, R.A. and E.H. Sage, *SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication*. Matrix Biol, 2001. **19**(8): p. 816-27.
54. Zhu, W., P. Robey, and B. AL, *The regulatory role of matrix proteins in mineralization of bone*, in *Osteoporosis, 3rd ed*, R. Marcus, et al., Editors. 2007, Academic Press: San Diego, CA,EEUU. p. 191-240.
55. Esbrit, P., *Hypercalcemia of malignancy--new insights into an old syndrome*. Clin Lab, 2001. **47**(1-2): p. 67-71.
56. Stewart, A.F., *Hyperparathyroidism, humoral hypercalcemia of malignancy, and the anabolic actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein on the skeleton*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(5): p. 758-62.
57. Strewler, G.J., *The physiology of parathyroid hormone-related protein*. N Engl J Med, 2000. **342**(3): p. 177-85.
58. Kartsogiannis, V., J. Moseley, B. McKelvie, S.T. Chou, D.K. Hards, K.W. Ng, T.J. Martin, and H. Zhou, *Temporal expression of PTHrP during endochondral bone formation in mouse and intramembranous bone formation in an in vivo rabbit model*. Bone, 1997. **21**(5): p. 385-92.
59. Amizuka, N., A.C. Karaplis, J.E. Henderson, H. Warshawsky, M.L. Lipman, Y. Matsuki, S. Ejiri, M. Tanaka, N. Izumi, H. Ozawa, and D. Goltzman, *Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development*. Dev Biol, 1996. **175**(1): p. 166-76.
60. Whitfield, J.F., *Parathyroid hormone-related protein (PTHrP): An ancient string of cytokines with many known and still unknown functions*, in *Novel aspects of PTHrP physiopathology*, C. Luparello, Editor. 2007, Nova science publishers, Inc. p. 1-25.

61. Martin, T.J., J.M. Moseley, and E.D. Williams, *Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine*. J Endocrinol, 1997. **154 Suppl**: p. S23-37.
62. Power, D.M., P.M. Ingleton, J. Flanagan, A.V. Canario, J. Danks, G. Elgar, and M.S. Clark, *Genomic structure and expression of parathyroid hormone-related protein gene (PTHrP) in a teleost, Fugu rubripes*. Gene, 2000. **250**(1-2): p. 67-76.
63. Broadus, A. and A.F. Stewart, *Chapter 7: Parathyroid Hormone-related Protein*, in *The Parathyroids*, J.P. Bilezikian, Editor. 1994, Raven Press Ltd.: New York. p. 259-275.
64. Dean, T., J.P. Vilardaga, J.T. Potts, Jr., and T.J. Gardella, *Altered selectivity of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) for distinct conformations of the PTH/PTHrP receptor*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(1): p. 156-66.
65. Rouffet, J., V. Coxam, N. Gaumet, and J.P. Barlet, *Preserved bone mass in ovariectomized rats treated with parathyroid-hormone-related peptide (1-34) and (107-111) fragments*. Reprod Nutr Dev, 1994. **34**(5): p. 473-81.
66. Horwitz, M.J., M.B. Tedesco, C. Gundberg, A. Garcia-Ocana, and A.F. Stewart, *Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(2): p. 569-75.
67. Stewart, A.F., R.L. Cain, D.B. Burr, D. Jacob, C.H. Turner, and J.M. Hock, *Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(8): p. 1517-25.

68. Stewart, A.F., *PTHrP(1-36) as a skeletal anabolic agent for the treatment of osteoporosis*. Bone, 1996. **19**(4): p. 303-6.
69. Jans, D.A., R.J. Thomas, and M.T. Gillespie, *Parathyroid hormone-related protein (PTHrP): a nucleocytoplasmic shuttling protein with distinct paracrine and intracrine roles*. Vitam Horm, 2003. **66**: p. 345-84.
70. Fiaschi-Taesch, N.M. and A.F. Stewart, *Minireview: parathyroid hormone-related protein as an intracrine factor--trafficking mechanisms and functional consequences*. Endocrinology, 2003. **144**(2): p. 407-11.
71. Boileau, G., H.S. Tenenhouse, L. Desgroseillers, and P. Crine, *Characterization of PHEX endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide 107-139 as a substrate and osteocalcin, PPi and phosphate as inhibitors*. Biochem J, 2001. **355**(Pt 3): p. 707-13.
72. Fenton, A.J., B.E. Kemp, R.G. Hammonds, Jr., K. Mitchelhill, J.M. Moseley, T.J. Martin, and G.C. Nicholson, *A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein; PTHrP[107-111]*. Endocrinology, 1991. **129**(6): p. 3424-6.
73. Fenton, A.J., B.E. Kemp, G.N. Kent, J.M. Moseley, M.H. Zheng, D.J. Rowe, J.M. Britto, T.J. Martin, and G.C. Nicholson, *A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts*. Endocrinology, 1991. **129**(4): p. 1762-8.
74. Fenton, A.J., T.J. Martin, and G.C. Nicholson, *Long-term culture of disaggregated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and reduction of osteoclast-like cell number by calcitonin and PTHrP[107-139]*. J Cell Physiol, 1993. **155**(1): p. 1-7.
75. Fenton, A.J., T.J. Martin, and G.C. Nicholson, *Carboxyl-terminal parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by isolated chicken osteoclasts*. J Bone Miner Res, 1994. **9**(4): p. 515-9.

76. Cornish, J., K.E. Callon, G.C. Nicholson, and I.R. Reid, *Parathyroid hormone-related protein-(107-139) inhibits bone resorption in vivo*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 1299-304.
77. Alonso, V., A.R. de Gortazar, J.A. Ardura, I. Andrade-Zapata, M.V. Alvarez-Arroyo, and P. Esbrit, *Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2*. J Cell Physiol, 2008. **217**(3): p. 717-27.
78. Whitfield, J.F., R.J. Isaacs, H. Jouishomme, S. MacLean, B.R. Chakravarthy, P. Morley, D. Barisoni, E. Regalia, and U. Armato, *C-terminal fragment of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107-111), stimulates membrane-associated protein kinase C activity and modulates the proliferation of human and murine skin keratinocytes*. J Cell Physiol, 1996. **166**(1): p. 1-11.
79. de Gortazar, A.R., V. Alonso, M.V. Alvarez-Arroyo, and P. Esbrit, *Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells in vitro*. Calcif Tissue Int, 2006. **79**(5): p. 360-9.
80. Brandt, D.W., M.E. Bruns, D.E. Bruns, J.E. Ferguson, 2nd, D.W. Burton, and L.J. Deftos, *The parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene preferentially utilizes a GC-rich promoter and the PTHrP 1-139 coding pathway in normal human amnion*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **189**(2): p. 938-43.
81. Burtis, W.J., *Evidence for the presence of an extreme carboxyterminal PTHrP in biological specimens*. J Bone Miner Res, 1992. **7** (Suppl 1): p. S225.
82. *Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group*. World Health Organ Tech Rep Ser, 1994. **843**: p. 1-129.

83. Schapira, D. and C. Schapira, *Osteoporosis: the evolution of a scientific term*. Osteoporos Int, 1992. **2**(4): p. 164-7.
84. Melton, L.J., 3rd, E.A. Chrischilles, C. Cooper, A.W. Lane, and B.L. Riggs, *How many women have osteoporosis? JBMR Anniversary Classic. JBMR, Volume 7, Number 9, 1992*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(5): p. 886-92.
85. Cauley, J.A., D.G. Seeley, K. Ensrud, B. Ettinger, D. Black, and S.R. Cummings, *Estrogen replacement therapy and fractures in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group*. Ann Intern Med, 1995. **122**(1): p. 9-16.
86. Lee, K., H. Jessop, R. Suswillo, G. Zaman, and L. Lanyon, *Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 389.
87. Manolagas, S.C. and R.L. Jilka, *Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis*. N Engl J Med, 1995. **332**(5): p. 305-11.
88. Cushing, H., *The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism)*. Bull Johns Hopkins Hosp, 1932. **50**: p. 137-195.
89. Saag, K.G., R. Koehnke, J.R. Caldwell, R. Brasington, L.F. Burmeister, B. Zimmerman, J.A. Kohler, and D.E. Furst, *Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events*. Am J Med, 1994. **96**(2): p. 115-23.
90. Clowes, J.A., N. Peel, and R. Eastell, *Glucocorticoid-induced osteoporosis*. Curr Opin Rheumatol, 2001. **13**(4): p. 326-32.
91. Nolla, J.M., C. Gomez-Vaquero, M. Romera, D. Roig-Vilaseca, A. Rozadilla, L. Mateo, J. Fiter, X. Juanola, J. Rodriguez-Moreno, J. Valverde, and D. Roig-Escofet, *Osteoporotic vertebral fracture in clinical*

*practice. 669 Patients diagnosed over a 10 year period.* J Rheumatol, 2001. **28**(10): p. 2289-93.

92. Ramsey-Goldman, R., *Missed opportunities in physician management of glucocorticoid-induced osteoporosis?* Arthritis Rheum, 2002. **46**(12): p. 3115-20.
93. Lukert, B.P. and L.G. Raisz, *Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management.* Ann Intern Med, 1990. **112**(5): p. 352-64.
94. Lane, N.E., *An update on glucocorticoid-induced osteoporosis.* Rheum Dis Clin North Am, 2001. **27**(1): p. 235-53.
95. Rubin, M.R. and J.P. Bilezikian, *Clinical review 151: The role of parathyroid hormone in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis: a re-examination of the evidence.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(9): p. 4033-41.
96. Canalis, E. and A. Giustina, *Glucocorticoid-induced osteoporosis: summary of a workshop.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5681-5.
97. Jia, D., C.A. O'Brien, S.A. Stewart, S.C. Manolagas, and R.S. Weinstein, *Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density.* Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5592-9.
98. Weinstein, R.S., J.R. Chen, C.C. Powers, S.A. Stewart, R.D. Landes, T. Bellido, R.L. Jilka, A.M. Parfitt, and S.C. Manolagas, *Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids.* J Clin Invest, 2002. **109**(8): p. 1041-8.
99. Hofbauer, L.C., F. Gori, B.L. Riggs, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg, and S. Khosla, *Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of*



*glucocorticoid-induced osteoporosis*. Endocrinology, 1999. **140**(10): p. 4382-9.

100. Kim, Y.H., J.H. Jun, K.M. Woo, H.M. Ryoo, G.S. Kim, and J.H. Baek, *Dexamethasone inhibits the formation of multinucleated osteoclasts via down-regulation of beta3 integrin expression*. Arch Pharm Res, 2006. **29**(8): p. 691-8.
101. Chua, C.C., B.H. Chua, Z. Chen, C. Landy, and R.C. Hamdy, *Dexamethasone induces caspase activation in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1642**(1-2): p. 79-85.
102. Weinstein, R.S., R.L. Jilka, A.M. Parfitt, and S.C. Manolagas, *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone*. J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 274-82.
103. O'Brien, C.A., D. Jia, L.I. Plotkin, T. Bellido, C.C. Powers, S.A. Stewart, S.C. Manolagas, and R.S. Weinstein, *Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength*. Endocrinology, 2004. **145**(4): p. 1835-41.
104. Kim, H.J., H. Zhao, H. Kitaura, S. Bhattacharyya, J.A. Brewer, L.J. Muglia, F.P. Ross, and S.L. Teitelbaum, *Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2152-60.
105. Ishida, Y. and J.N. Heersche, *Glucocorticoid-induced osteoporosis: both in vivo and in vitro concentrations of glucocorticoids higher than physiological levels attenuate osteoblast differentiation*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(12): p. 1822-6.
106. Homme, M., C.P. Schmitt, R. Himmele, G.F. Hoffmann, O. Mehls, and F. Schaefer, *Vitamin D and dexamethasone inversely regulate parathyroid hormone-induced regulator of G protein signaling-2 expression in osteoblast-like cells*. Endocrinology, 2003. **144**(6): p. 2496-504.

107. Ahlstrom, M., M. Pekkinen, and C. Lamberg-Allardt, *Dexamethasone downregulates the expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in mesenchymal stem cells*. Steroids, 2009. **74**(2): p. 277-82.
108. Pufe, T., K.E. Scholz-Ahrens, A.T. Franke, W. Petersen, R. Mentlein, D. Varoga, B. Tillmann, J. Schrezenmeir, and C.C. Gluer, *The role of vascular endothelial growth factor in glucocorticoid-induced bone loss: evaluation in a minipig model*. Bone, 2003. **33**(6): p. 869-76.
109. Jee, W.S. and W. Yao, *Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2001. **1**(3): p. 193-207.
110. Li, X.J. and W.S. Jee, *Adaptation of diaphyseal structure to aging and decreased mechanical loading in the adult rat: a densitometric and histomorphometric study*. Anat Rec, 1991. **229**(3): p. 291-7.
111. Manolagas, S.C. and R.S. Weinstein, *New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(7): p. 1061-6.
112. Thompson, D.D., H.A. Simmons, C.M. Pirie, and H.Z. Ke, *FDA Guidelines and animal models for osteoporosis*. Bone, 1995. **17**(4 Suppl): p. 125S-133S.
113. Aerssens, J., S. Boonen, G. Lowet, and J. Dequeker, *Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research*. Endocrinology, 1998. **139**(2): p. 663-70.
114. Taxel, P., *Osteoporosis: detection, prevention, and treatment in primary care*. Geriatrics, 1998. **53**(8): p. 22-3, 27-8, 33 passim.
115. Dalsky, G.P., K.S. Stocke, A.A. Ehsani, E. Slatopolsky, W.C. Lee, and S.J. Birge, Jr., *Weight-bearing exercise training and lumbar bone mineral content in postmenopausal women*. Ann Intern Med, 1988. **108**(6): p. 824-8.

116. Prestwood, K.M., A.M. Kenny, C. Unson, and M. Kulldorff, *The effect of low dose micronized 17 $\alpha$ -estradiol on bone turnover, sex hormone levels, and side effects in older women: a randomized, double blind, placebo-controlled study*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(12): p. 4462-9.
117. Prestwood, K.M., A.M. Kenny, A. Kleppinger, and M. Kulldorff, *Ultralow-dose micronized 17 $\beta$ -estradiol and bone density and bone metabolism in older women: a randomized controlled trial*. Jama, 2003. **290**(8): p. 1042-8.
118. Shang, Y. and M. Brown, *Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2465-8.
119. Draper, M.W., D.E. Flowers, W.J. Huster, J.A. Neild, K.D. Harper, and C. Arnaud, *A controlled trial of raloxifene (LY139481) HCl: impact on bone turnover and serum lipid profile in healthy postmenopausal women*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(6): p. 835-42.
120. Russell, R.G., *Bisphosphonates: from bench to bedside*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1068**: p. 367-401.
121. Reid, I.R., J.P. Brown, P. Burckhardt, Z. Horowitz, P. Richardson, U. Trechsel, A. Widmer, J.P. Devogelaer, J.M. Kaufman, P. Jaeger, J.J. Body, M.L. Brandi, J. Broell, R. Di Micco, A.R. Genazzani, D. Felsenberg, J. Happ, M.J. Hooper, J. Ittner, G. Leeb, H. Mallmin, T. Murray, S. Ortolani, A. Rubinacci, M. Saaf, G. Samsioe, L. Verbruggen, and P.J. Meunier, *Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density*. N Engl J Med, 2002. **346**(9): p. 653-61.
122. Mashiba, T., T. Hirano, C.H. Turner, M.R. Forwood, C.C. Johnston, and D.B. Burr, *Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(4): p. 613-20.

123. Odvina, C.V., J.E. Zerwekh, D.S. Rao, N. Maalouf, F.A. Gottschalk, and C.Y. Pak, *Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(3): p. 1294-301.
124. Sellye, H., *On the stimulation of new bone formation with parathyroid extract and irradiated ergosterol*. Endocrinology, 1932. **16**: p. 547-58.
125. Cosman, F., *Parathyroid hormone treatment for osteoporosis*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2008. **15**(6): p. 495-501.
126. Goltzman, D., *Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(2): p. 173-7.
127. Canalis, E., M. Centrella, W. Burch, and T.L. McCarthy, *Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures*. J Clin Invest, 1989. **83**(1): p. 60-5.
128. Wu, Y. and R. Kumar, *Parathyroid hormone regulates transforming growth factor beta1 and beta2 synthesis in osteoblasts via divergent signaling pathways*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(5): p. 879-84.
129. Frolik, C.A., E.C. Black, R.L. Cain, J.H. Satterwhite, P.L. Brown-Augsburger, M. Sato, and J.M. Hock, *Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure*. Bone, 2003. **33**(3): p. 372-9.
130. Reid, I.R., *The roles of calcium and vitamin D in the prevention of osteoporosis*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1998. **27**(2): p. 389-98.
131. Cornish, J., K.E. Callon, C. Lin, C. Xiao, J.M. Moseley, and I.R. Reid, *Stimulation of osteoblast proliferation by C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(6): p. 915-22.
132. Esbrit, P., M.V. Alvarez-Arroyo, F. De Miguel, O. Martin, M.E. Martinez, and C. Caramelo, *C-terminal parathyroid hormone-related protein*

*increases vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells.*  
J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(6): p. 1085-92.

133. Brandi, M.L. and P. Collin-Osdoby, *Vascular biology and the skeleton.* J Bone Miner Res, 2006. **21**(2): p. 183-92.
134. Deschaseaux, F., L. Sensebe, and D. Heymann, *Mechanisms of bone repair and regeneration.* Trends Mol Med, 2009. **15**(9): p. 417-29.
135. Nunamaker, D.M., *Experimental models of fracture repair.* Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S56-65.
136. Holstein, J.H., P. Garcia, T. Histing, A. Kristen, C. Scheuer, M.D. Menger, and T. Pohlemann, *Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration.* J Orthop Trauma, 2009. **23**(5 Suppl): p. S31-8.
137. Bab, I.A., *Postablation bone marrow regeneration: an in vivo model to study differential regulation of bone formation and resorption.* Bone, 1995. **17**(4 Suppl): p. 437S-441S.
138. Shimizu, T., R. Mehdi, Y. Yoshimura, H. Yoshikawa, S. Nomura, K. Miyazono, and K. Takaoka, *Sequential expression of bone morphogenetic protein, tumor necrosis factor, and their receptors in bone-forming reaction after mouse femoral marrow ablation.* Bone, 1998. **23**(2): p. 127-33.
139. Yamashita, T., H. Yoshitake, K. Tsuji, N. Kawaguchi, Y. Nabeshima, and M. Noda, *Retardation in bone resorption after bone marrow ablation in klotho mutant mice.* Endocrinology, 2000. **141**(1): p. 438-45.
140. Tsuji, K., T. Komori, and M. Noda, *Aged mice require full transcription factor, Runx2/Cbfa1, gene dosage for cancellous bone regeneration after bone marrow ablation.* J Bone Miner Res, 2004. **19**(9): p. 1481-9.
141. Kondo, N., K. Tokunaga, T. Ito, K. Arai, N. Amizuka, L. Minqi, H. Kitahara, M. Ito, M. Naito, J. Shu-Ying, K. Oda, T. Murai, R. Takano, A.

- Ogose, and N. Endo, *High dose glucocorticoid hampers bone formation and resorption after bone marrow ablation in rat*. Microsc Res Tech, 2006. **69**(10): p. 839-46.
142. Lu, H., D. Kraut, L.C. Gerstenfeld, and D.T. Graves, *Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation*. Endocrinology, 2003. **144**(1): p. 346-52.
143. Okuda, N., S. Takeda, K. Shinomiya, T. Muneta, S. Itoh, M. Noda, and Y. Asou, *ED-71, a novel vitamin D analog, promotes bone formation and angiogenesis and inhibits bone resorption after bone marrow ablation*. Bone, 2007. **40**(2): p. 281-92.
144. Mattsson, G., P.O. Carlsson, K. Olausson, and L. Jansson, *Histological markers for endothelial cells in endogenous and transplanted rodent pancreatic islets*. Pancreatology, 2002. **2**(2): p. 155-62.
145. Redlich, K., S. Hayer, R. Ricci, J.P. David, M. Tohidast-Akrad, G. Kollias, G. Steiner, J.S. Smolen, E.F. Wagner, and G. Schett, *Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction*. J Clin Invest, 2002. **110**(10): p. 1419-27.
146. Ikeda, T., M. Kasai, J. Suzuki, H. Kuroyama, S. Seki, M. Utsuyama, and K. Hirokawa, *Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 47217-22.
147. Wada, S., S. Yasuda, T. Nagai, T. Maeda, S. Kitahama, S. Suda, D.M. Findlay, M. Iitaka, and S. Katayama, *Regulation of calcitonin receptor by glucocorticoid in human osteoclast-like cells prepared in vitro using receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and macrophage colony-stimulating factor*. Endocrinology, 2001. **142**(4): p. 1471-8.
148. Hahn, M., M. Vogel, M. Pompesius-Kempa, and G. Delling, *Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture*. Bone, 1992. **13**(4): p. 327-30.

149. Odgaard, A., *Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture*. Bone, 1997. **20**(4): p. 315-28.
150. Stein, G.S., J.B. Lian, A.J. van Wijnen, J.L. Stein, M. Montecino, A. Javed, S.K. Zaidi, D.W. Young, J.Y. Choi, and S.M. Pockwinse, *Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4315-29.
151. Hung, S.H., C.H. Yeh, H.T. Huang, P. Wu, M.L. Ho, C.H. Chen, C. Wang, D. Chao, and G.J. Wang, *Pioglitazone and dexamethasone induce adipogenesis in D1 bone marrow stromal cell line, but not through the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway*. Life Sci, 2008. **82**(11-12): p. 561-9.
152. McLaughlin, F., J. Mackintosh, B.P. Hayes, A. McLaren, I.J. Uings, P. Salmon, J. Humphreys, E. Meldrum, and S.N. Farrow, *Glucocorticoid-induced osteopenia in the mouse as assessed by histomorphometry, microcomputed tomography, and biochemical markers*. Bone, 2002. **30**(6): p. 924-30.
153. Yao, W., Z. Cheng, A. Pham, C. Busse, E.A. Zimmermann, R.O. Ritchie, and N.E. Lane, *Glucocorticoid-induced bone loss in mice can be reversed by the actions of parathyroid hormone and risedronate on different pathways for bone formation and mineralization*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(11): p. 3485-97.
154. Martinez, P., P. Esbrit, A. Rodrigo, M.V. Alvarez-Arroyo, and M.E. Martinez, *Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells*. Osteoporos Int, 2002. **13**(11): p. 874-81.
155. Jacobsen, K.A., Z.S. Al-Aql, C. Wan, J.L. Fitch, S.N. Stapleton, Z.D. Mason, R.M. Cole, S.R. Gilbert, T.L. Clemens, E.F. Morgan, T.A. Einhorn, and L.C. Gerstenfeld, *Bone formation during distraction osteogenesis is dependent on both VEGFR1 and VEGFR2 signaling*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(5): p. 596-609.

156. Villarino, M.E., L.M. Sanchez, C.B. Bozal, and A.M. Ubios, *Influence of short-term diabetes on osteocytic lacunae of alveolar bone. A histomorphometric study*. Acta Odontol Latinoam, 2006. **19**(1): p. 23-8.
157. Zhang, Q., E. Cuartas, N. Mehta, J. Gilligan, H.Z. Ke, W.M. Saltzman, M. Kotas, M. Ma, S. Rajan, C. Chalouni, J. Carlson, and A. Vignery, *Replacement of bone marrow by bone in rat femurs: the bone bioreactor*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(2): p. 237-46.
158. Iida-Klein, A., H. Zhou, S.S. Lu, L.R. Levine, M. Ducayen-Knowles, D.W. Dempster, J. Nieves, and R. Lindsay, *Anabolic action of parathyroid hormone is skeletal site specific at the tissue and cellular levels in mice*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(5): p. 808-16.
159. Zhou, H., A. Iida-Klein, S.S. Lu, M. Ducayen-Knowles, L.R. Levine, D.W. Dempster, and R. Lindsay, *Anabolic action of parathyroid hormone on cortical and cancellous bone differs between axial and appendicular skeletal sites in mice*. Bone, 2003. **32**(5): p. 513-20.
160. von Stechow, D., S. Fish, D. Yahalom, I. Bab, M. Chorev, R. Muller, and J.M. Alexander, *Does simvastatin stimulate bone formation in vivo?* BMC Musculoskelet Disord, 2003. **4**: p. 8.
161. Kasukawa, Y., N. Miyakoshi, A.K. Srivastava, K. Nozaka, S. Maekawa, D.J. Baylink, S. Mohan, and E. Itoi, *The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib reduces bone resorption, but not bone formation, in ovariectomized mice in vivo*. Tohoku J Exp Med, 2007. **211**(3): p. 275-83.
162. Alexander, J.M., I. Bab, S. Fish, R. Muller, T. Uchiyama, G. Gronowicz, M. Nahounou, Q. Zhao, D.W. White, M. Chorev, D. Gazit, and M. Rosenblatt, *Human parathyroid hormone 1-34 reverses bone loss in ovariectomized mice*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(9): p. 1665-73.
163. Everhart-Caye, M., S.E. Inzucchi, J. Guinness-Henry, M.A. Mitnick, and A.F. Stewart, *Parathyroid hormone (PTH)-related protein(1-36) is equipotent to PTH(1-34) in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(1): p. 199-208.



164. Andersson, N., M.K. Lindberg, C. Ohlsson, K. Andersson, and B. Ryberg, *Repeated in vivo determinations of bone mineral density during parathyroid hormone treatment in ovariectomized mice*. J Endocrinol, 2001. **170**(3): p. 529-37.